

MODULATION AKUTER UND
CHRONISCHER OPIOIDWIRKUNGEN
IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM
DURCH BAKTERIELLE
NEUROTOXINE

Bettina Lux

*Dr. ss
München
1986*

Aus der Abteilung für Neuropharmakologie
des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie
in München

Leiter: Prof. Dr. A. Herz

MODULATION AKUTER UND CHRONISCHER OPIOIDWIRKUNGEN
IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM
DURCH BAKTERIELLE NEUROTOXINE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

Bettina Lux

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Herz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 1. 1986

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<u>1. EINLEITUNG</u>	5
1.1. Akute und chronische Opioidwirkungen	5
1.2. Verwendung isolierter Organe zum Studium von Opioiden	6
1.3. Mechanismen von Opioidtoleranz und -abhängigkeit: experimentelle Ansätze	7
1.4. Eingriffe in die Signaltransmission von Opioidrezeptoren durch Choleratoxin und Pertussistoxin	10
1.5. Problemstellung	13
 <u>2. METHODEN</u>	 15
2.1. Durchführung der Versuche	15
2.1.1. Präparation und Versuchsaufbau	15
2.1.2. Applikation der Testsubstanzen	17
2.1.3. Induktion von Opioidtoleranz und -abhängigkeit	18
2.1.4. Anwendung von Cholera- und Pertussistoxin	20
2.2. Tiere, Substanzen, Geräte	21
2.3. Auswertung und Statistik	22
 <u>3. ERGEBNISSE</u>	 24
3.1. In vitro-Exposition des Plexus myentericus-Längsmuskelpräparates des Meerschweinchenileums mit Choleratoxin	24
3.1.1. Naive Präparate	24
3.1.2. Opioidabhängige Präparate	28
3.2. Neuronale Funktionen des isolierten Organs nach in vivo-Behandlung von Meerschweinchen mit Choleratoxin	32
3.3. In vitro-Exposition des Plexus myentericus-Längsmuskelpräparates mit Pertussistoxin	33

3.4. Neuronale Funktionen des isolierten Organs nach in vivo-Behandlung von Meerschweinchen mit Pertussistoxin	35
3.4.1. Naive Präparate	35
3.4.2. Opioidabhängige Präparate	45
3.4.3. Präparate nach chronischer Clonidinbe- handlung	51
3.5. Kombinierte Anwendung von Cholera- und Pertussis- toxin am Plexus myentericus-Längsmuskelpräparat	51
3.6. Versuche am isolierten Ductus deferens der Maus	53
3.6.1. Exposition mit Choleratoxin	53
3.6.2. Exposition mit Pertussistoxin	54

4. DISKUSSION 56

4.1. Allgemeine Charakteristika inhibitorischer und exzitatorischer Funktionen an naiven und chronisch opioidbehandelten isolierten Organen	56
4.2. Spezifität der Effekte von Cholera- und Per- tussistoxin	58
4.3. Studien am Plexus myentericus-Längsmuskelprä- parat	62
4.3.1. Wirkungen von Choleratoxin	62
4.3.2. Wirkungen von Pertussistoxin	63
4.4. Studien am isolierten Ductus deferens	69
4.5. Schlußfolgerungen bezüglich der Mechanismen von Opioidtoleranz und -abhängigkeit	69

5. ZUSAMMENFASSUNG 72

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 75

7. LITERATURVERZEICHNIS 76

1. EINLEITUNG

1.1. Akute und chronische Opioidwirkungen

Bereits in der Antike war das aus dem Saft des Schlafmohns gewonnene Opium als Heil- und als Genußmittel bekannt. Obwohl die Folgen der mißbräuchlichen Einnahme von Opium, nämlich Gewöhnung mit kontinuierlicher Dosissteigerung (Toleranz) und Abstinenzerscheinungen, seit Jahrhunderten beschrieben worden sind, hat man erst im 19. Jahrhundert - nach der Isolation des Morphins (1803) und der Einführung der subkutanen Injektionstechnik - den Mißbrauch als Krankheit erkannt und diese als "Sucht" bezeichnet (Haas, 1981). Entsprechend einem Vorschlag der Weltgesundheitsorganisation ist der unpräzise Begriff "Sucht" durch die Bezeichnungen "physische und psychische Abhängigkeit" ersetzt worden (WHO, 1974).

Alle Opioidagonisten zeigen neben der analgetischen Wirkung die Fähigkeit, Toleranz und Abhängigkeit zu erzeugen. Dies gilt grundsätzlich auch für die seit 1975 entdeckten endogenen Opioidpeptide, die bei exogener Zufuhr diese Phänomene induzieren oder aufrechterhalten können (Wei und Loh, 1976; Schulz und Herz, 1976b). Während Toleranz durch eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber dem Opioid charakterisiert ist, läßt sich physische Abhängigkeit nur durch Entzug des Opioids aufdecken (Goldstein, 1974). Das Abstinenzsyndrom ist u.a. gekennzeichnet durch allgemeine Unruhe, Tremor, Schwitzen, Mydriasis, Erbrechen, Diarrhoe, Blutdruck- und Herzfrequenzerhöhung, Reflexsteigerung, Hyperalgesie und Muskelkrämpfe. Wird der Entzug durch den Opioidantagonisten Naloxon präzipitiert, d.h. durch eine Verdrängung des Agonisten vom Rezeptor, treten die beschriebenen Symptome schneller und mit verstärkter Intensität auf (Jaffe, 1980).

1.2. Verwendung isolierter Organe zum Studium von Opioiden

Opioidrezeptoren sind nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern auch an Zellen endokriner Organe und im peripheren Nervensystem lokalisiert (Hughes, 1981). Um die biochemischen Mechanismen der Phänomene Toleranz und Abhängigkeit in neuronalen Strukturen von weniger kompliziertem Aufbau als dem zentralen Nervensystem studieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit der isolierte Längsmuskel mit dem Plexus myentericus des Meerschweinchenileums und der isolierte Samenleiter der Maus ausgewählt. Beide Präparate gelten als klassische Organe zur Untersuchung opioidderger Mechanismen (Schulz, 1978).

Nachdem 1973 der Nachweis stereospezifischer, sättigbarer Bindungsstellen mit hoher Affinität für Opiode im Gehirn gelungen war (Pert und Snyder, 1973; Terenius, 1973; Simon et al., 1973), konnten diese auch in den genannten Präparationen gezeigt werden (Pert und Snyder, 1973; Terenius, 1975; Leslie und Kosterlitz, 1979). Opioidrezeptoren in peripheren Organen und im zentralen Nervensystem weisen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften große Ähnlichkeiten auf. Die Verwendung von isolierten Organen bietet gegenüber dem Studium von Opioideffekten am intakten Organismus erhebliche Vorteile, da z.B. Probleme der Pharmakokinetik in vitro keine oder nur eine geringe Rolle spielen. Nicht zuletzt lassen sich an ihnen in reproduzierbarer Weise die Wirkungen chronischer Opioidbehandlung demonstrieren (Schulz, 1978).

Die Wand des Ileums besteht aus mehreren Schichten (Mukosa, Submukosa und Muskularis mit der inneren Ring- und der äußeren Längsmuskelschicht), die von zwei Nervenplexen innerviert werden: in der Submukosa liegt der Meissner'sche Plexus, zwischen Ring- und Längsmuskulatur der Auerbach'sche Plexus (Plexus myentericus). Bei elektronenmikroskopischer Untersuchung des letzteren finden sich in der kompakten Anordnung der Zellen Ähnlichkeiten mit der Feinstruktur des zentralen Nervensystems (Gabella, 1972).

Für das Studium von Opioidwirkungen benutzt man statt des gesamten Ileums häufig allein den Längsmuskel mit dem anhaftendem Plexus myentericus (Kosterlitz et al., 1970). Elektrische Stimulation dieses Präparats führt zur Freisetzung von Acetylcholin an der neuromuskulären Synapse und damit zu einer Muskelkontraktion (Paton, 1955). Opioide, die im Plexus myentericus postganglionär angreifen (Dingledine und Goldstein, 1976; Collier, 1980), hemmen dosisabhängig die Acetylcholinfreisetzung (Paton, 1957; Gyang und Kosterlitz, 1966), wobei ihre pharmakologische Potenz gut mit der jeweiligen analgetischen Wirksamkeit im zentralen Nervensystem korreliert; der Effekt ist stereoselektiv (d.h. auf die (-)-Isomere beschränkt) und durch den Opioidantagonisten Naloxon blockierbar (Kosterlitz und Waterfield, 1975).

Die Wirkung von Opioiden auf die Transmitterfreisetzung an Synapsen des peripheren Nervensystems variiert spezies- und organabhängig. So hemmen Opioide am Samenleiter der Maus die noradrenerge Übertragung an der neuromuskulären Endplatte (Henderson et al., 1972). Der Ductus deferens unterscheidet sich jedoch neuroanatomisch wesentlich von der Längsmuskel-Plexus myentericus-Präparation des Ileums. Der Plexus hypogastricus, der den Samenleiter sympathisch innerviert, liegt unterhalb der Aortenbifurkation und wird somit bei der Entnahme des Organs abgetrennt; der isolierte Ductus deferens der Maus enthält daher keine Nervensomata, sondern nur Axone und Nervenendigungen. Dieses Präparat dient seit der Entdeckung der körpereigenen Opioidpeptide als empfindliches Testsystem für Enkephaline (Lord et al., 1976), hat sich aber wegen seines neuronalen Aufbaus auch für die Erforschung chronischer Opioidwirkungen als bedeutsam erwiesen (Schulz et al., 1980).

1.3. Mechanismen von Opioidtoleranz und -abhängigkeit: experimentelle Ansätze

Opioidtoleranz und -abhängigkeit wurden als gemeinsam auf-

tretende Phänomene bei Tier und Mensch wiederholt beschrieben (Martin, 1968; Goldstein, 1974). Diese Beobachtung inspirierte Theorien, die einen gemeinsamen biochemischen Mechanismus für beide Phänomene zugrundelegen. Die Spekulationen verschiedener Autoren konzentrierten sich auf adaptive Veränderungen enzymatischer Systeme (Shuster, 1961; Goldstein und Goldstein, 1961), wobei die "Enzymexpansionstheorie" die größte Bedeutung gewann (Goldstein und Goldstein, 1968).

Als für bestimmte Opioidwirkungen möglicherweise verantwortlicher Mediator fand das zyklische Adenosin-3'5'-Monophosphat (cAMP) besonderes Interesse, das als "second messenger" für zahlreiche Hormone und Neurotransmitter fungiert. So konnte sowohl im Hirnhomogenat der Ratte (Collier und Roy, 1974) als auch an neuronalen Hybridzellen (Traber et al., 1975) die Naloxon-antagonisierbare Verminderung der cAMP-Akkumulation durch akute Opioidbehandlung demonstriert werden. Diese Befunde ließen Sharma und Nirenberg (1975) vermuten, daß für die Entwicklung von Opioidtoleranz und -abhängigkeit der Adenylatzyklase eine entscheidende Funktion zukommen könnte. Sie fanden in chronisch morphinbehandelten Hybridzellen eine Zunahme der Adenylatzyklase-Aktivität und nach Applikation von Naloxon als "Entzugssymptom" eine starke Erhöhung der cAMP-Konzentration. Diese Arbeit stützte die "unitary theory", indem sowohl Toleranz als auch Abhängigkeit mit der Adaptation der Adenylatzyklase erklärt wurden. Neuere Studien zogen diese Ergebnisse jedoch in Zweifel. Neuronale Hybridzellen besitzen nicht nur Opioid-, sondern auch Membranrezeptoren für andere inhibitorisch wirkende Agonisten, die über die Adenylatzyklase die Synthese von cAMP hemmen können (Sabol und Nirenberg, 1979). Bei einer Adaptation auf der Ebene des Enzyms müßte man eine heterologe Toleranzentwicklung für an dieses System gekoppelte Rezeptoren erwarten. Dies wurde nicht bestätigt (Wüster et al., 1983).

In Opioidbindungsstudien konnte nach chronischer Opioidbehandlung keine Änderung der Affinität oder der Anzahl der

Bindungsstellen beobachtet werden (Höllt und Wüster, 1978); dies gilt ebenfalls für Präparationen des Meerschweinchenileums und des Ductus deferens der Maus (Cox und Padhya, 1977; Rubini et al., 1982). Neuere Befunde an Neuroblastomzellen deuten auf eine Verminderung der Rezeptordichte nach chronischer Opioidexposition hin (Chang et al., 1982; Law et al., 1982), doch manifestiert sich dies erst bei Opioiddosierungen, die die zur Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit erforderlichen Konzentrationen weit übersteigen (Wüster et al., 1985).

Neben Untersuchungen am intakten Organismus und an Kulturen von neuronalen Hybridzellen hat die Verwendung isolierter Organe wichtige Beiträge zur Aufklärung der Mechanismen von Opioidtoleranz und -abhängigkeit geliefert. Die Diskussion über die Frage einer "zellulären Abhängigkeit" (Collier, 1980), die an Neuronen, an denen Opioidrezeptoren lokalisiert sind, grundsätzlich mit Toleranz einhergeht, ist nicht abgeschlossen. Experimentelle Befunde für ein separates Auftreten beider Phänomene, z.B. in neurophysiologischen Studien, liegen ebenfalls vor (Andrade et al., 1983; Johnson und Duggan, 1984). Während das Plexus myentericus-Präparat des Meerschweinchenileums sowohl Toleranz (verminderte Opioidempfindlichkeit) als auch Abhängigkeit (Naloxon-präzipitierte massive Acetylcholin-Freisetzung, die sich als Kontraktion des Längsmuskels manifestiert) zeigt (Schulz und Herz, 1976a; Schulz, 1978), läßt sich am isolierten Ductus deferens der Maus interessanterweise auch bei außerordentlich hohen Toleranzgraden kein Entzugssymptom nachweisen (Gillan et al., 1979; Schulz et al., 1980). An der Plexus myentericus-Präparation wurde eine differierende Entwicklung der Phänomene Toleranz und Abhängigkeit festgestellt: so erreicht die Abhängigkeit ihr Maximum schon bei sehr geringen Toleranzgraden. Danach nimmt nur noch das Ausmaß der Toleranz zu, nicht jedoch der Grad der Abhängigkeit (Schulz et al., 1982).

Trotz zahlreicher interessanter Einzelbefunde sind die

biochemischen Mechanismen, die den beiden Phänomenen zugrundeliegen, noch weit von ihrer Aufklärung entfernt. Weitere Aufschlüsse erhofft man sich daher auf molekularer Ebene durch die Untersuchung der Opioidrezeptor-kontrollierten Signaltransmission in den Neuronen. Insbesondere sollten spezielle bakterielle Toxine, die exzitatorische und inhibitorische Neurotransmission modulieren können, hilfreich für das Studium von Opioidtoleranz und -abhängigkeit sein.

1.4. Eingriffe in die Signaltransmission von Opioidrezeptoren durch Choleratoxin und Pertussistoxin

Opioide wirken wie viele andere Hormone und Neuromodulatoren über spezifische Membranrezeptoren, die wiederum mit dem Adenylatzyklasesystem assoziiert sind. Dieses wurde im letzten Jahrzehnt intensiv erforscht, wobei man feststellte, daß Rezeptoren nicht direkt mit der katalytischen Einheit zusammenwirken, sondern daß ein regulatorisches System zwischengeschaltet ist. Die Verbindung zwischen Rezeptor und Adenylatzyklase wird durch ein guaninnukleotidbindendes Protein ("G-Protein") hergestellt (Rodbell, 1980; Gilman, 1984). Zu dieser Proteinklasse mit regulatorischer Funktion gehören z.B. auch Kofaktoren der Proteinsynthese und das durch Rhodopsin aktivierbare Transducin in den Stäbchenaußensegmenten der Vertebratenretina (Hughes, 1983).

Die Signaltransmission exzitatorischer Rezeptoren wird durch die sog. N_s -Einheit (auch: G_s -Protein), die Inhibition der Adenylatzyklase durch die N_i -Einheit (auch: G_i -Protein) vermittelt (Rodbell, 1980; Abb. 1).

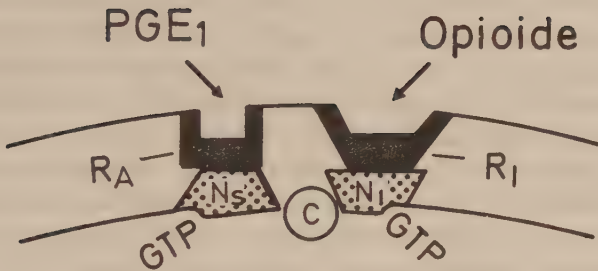


Abb. 1

Modell der rezeptorvermittelten Regulation der Adenylatzyklase (C) durch exzitatorische (z.B. PGE₁) und inhibitorische (z.B. Opioiden) Neuromodulatoren. Exzitatorische Rezeptoren (R_A) können die Adenylatzyklase-Aktivität über ein stimulatorisches GTP-bindendes Protein (N_s), inhibitorische Rezeptoren (R_I) über ein inhibitorisches GTP-bindendes Protein (N_i) steuern. N_s wird durch Cholera-toxin, N_i durch Pertussistoxin modifiziert. Nach Rodbell, 1980.

Die G-Proteine sind Heterotrimere (Hildebrandt et al., 1984), deren GTP-bindende α -Untereinheiten das größte Molekulargewicht (>40000) aufweisen. Die etwas kleineren β -Untereinheiten scheinen für G_s und G_i identisch zu sein. Ob die neuerdings entdeckten γ -Untereinheiten (MG ca. 5000) sich im Aufbau gleichen, ist noch ungeklärt (Hildebrandt et al., 1984). Wenn ein exzitatorisch wirkender Agonist den Rezeptor besetzt, bewirkt GTP eine Konformationsänderung der α -Untereinheit von G_s, die zur Dissoziation der Untereinheiten führt und die Aktivierung der katalytischen Einheit ermöglicht (Houslay, 1984). Die Signalübermittlung inhibitorischer Rezeptoren benötigt ebenfalls GTP und geht mit der Dissoziation der Untereinheiten von G_i einher. Beiden G-Proteinen ist jeweils eine GTPase-Aktivität zugeordnet (Aktories et al., 1982; Sunyer et al., 1984). Der GTP-Hydrolyse folgt eine Reassoziierung der Untereinheiten, womit der Prozeß der Informa-

tionsübermittlung von neuem beginnen kann (Houslay, 1984).

Koski und Klee (1981) haben gezeigt, daß die Inhibition der Adenylatzyklase durch Opiode mit der Stimulation einer GTPase-Aktivität verbunden ist. Der Aktivitätszustand der GTP-bindenden Proteine kontrolliert nicht nur die Funktion der katalytischen Einheit, sondern wirkt auch auf die Affinität der Bindung zwischen Rezeptor und Agonist zurück: z.B. werden durch die Zugabe von Guaninnukleotiden Bindungseigenschaften des Opioidrezeptors beeinflusst (Blume, 1978; Childers und Snyder, 1980).

Die G-Proteine haben besonderes Interesse auch wegen ihrer spezifischen Interaktion mit bestimmten bakteriellen Toxinen gefunden. Die Regulationsproteine sind Substrate für Choleratoxin (G_s) und Pertussistoxin (G_i). Choleratoxin katalysiert die ADP-Ribosylierung der GTP-bindenden α -Untereinheit von G_s (Cassel und Pfeuffer, 1978; Gill und Meren, 1978). Dies hat eine Verminderung der intrinsischen GTPase-Aktivität und somit eine dauerhafte Stimulation der Adenylatzyklase zur Folge (Gill und Meren, 1978). Diese Stabilisierung bewirkt letztlich eine Unterbrechung der exzitatorischen Signaltransmission. Choleratoxin hat keinen Einfluß auf inhibitorische Mechanismen, d.h. sein Effekt ist hochspezifisch für G_s (Aktories et al., 1982; Smith und Limbird, 1982). Pertussistoxin, nach einer seiner ursprünglich entdeckten biologischen Wirkungen auch "islet-activating protein" (IAP) genannt (Yayima et al., 1978), wirkt durch die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit von G_i (Katada und Ui, 1982) und inaktiviert somit ebenfalls die intrinsische GTPase-Aktivität. Die Kopplung von G_i an inhibitorische Rezeptoren und die Interaktion mit der katalytischen Einheit wird blockiert, so daß inhibitorische Agonisten ihre Wirkung verlieren (Ui, 1984). Analog zum Choleratoxin ist der Effekt von IAP spezifisch auf G_i beschränkt (Hildebrandt et al., 1983).

Durch die selektive Modifikation der G_s - bzw. G_i -Proteine haben sich Choleratoxin und IAP als wichtige Werkzeuge zum

Studium von Rezeptorkoppelungsmechanismen und Signalübermittlung exzitatorischer bzw. inhibitorischer Rezeptoren erwiesen (Gilman, 1984; Spiegel et al., 1985). So wurden auch Opioidrezeptorfunktionen mit Hilfe dieser Toxine an verschiedenen Präparationen untersucht, z.B. an neuronalen Hybridzellen oder Striatummembranen. Nach Vorbehandlung von Hybridzellen mit Choleratoxin konnten Opioidagonisten die Adenylatzyklase weiterhin hemmen (Probst und Hamprecht, 1981), während die Inkubation mit IAP sowohl die opioidinduzierte Inhibition der Adenylatzyklase (Costa et al., 1983; Abood et al., 1985) als auch die GTPase-Stimulation durch Opiode (Burns et al., 1983) blockierte. Zudem verändert die Vorbehandlung mit IAP auch Bindungseigenschaften des inhibitorischen Rezeptors. Es kommt zu einer "Entkoppelung" des der Bindungsseite nachgeschalteten Systems, die der Desensitivierung nach chronischer Opioidapplikation ähnelt (Costa et al., 1983).

1.5. Problemstellung

Die an neuronalen Hybridzellen gewonnene Beobachtung, daß die Blockade der inhibitorischen Signalübertragung vom Opioidrezeptor durch IAP in ihrer Kinetik der Desensitivierung durch chronische Opioidbehandlung gleicht (Costa et al., 1983; Wüster et al., 1985), läßt vermuten, daß GTP-bindende Proteine in die adaptiven Vorgänge bei langandauernder Aktivierung des Opioidrezeptors involviert sein könnten. An neuronalen Hybridzellen läßt sich nur der Mechanismus der Toleranzentwicklung unter diesem Aspekt untersuchen, da ein Entzugssymptom und somit Abhängigkeit nicht nachgewiesen werden konnten (Wüster et al., 1983). Zudem lassen sich Mechanismen, die an isolierten Hybridzellen in Kultur beobachtet werden, in ihrer Wirkungsweise nur mit Vorbehalt auf die Verhältnisse in intakten neuronalen Netzwerken übertragen.

Daher erschien es wichtig, die Funktion der G-Proteine für opioid-induzierte adaptive Prozesse an der Plexus myente-

ricus-Längsmuskel-Präparation zu studieren, da dieses isolierte Organ eine intakte nervöse Versorgung aufweist und chronische Aktivierung von Opioidrezeptoren sowohl zu Toleranz als auch zu Abhängigkeit führt. Choleratoxin und IAP dienten hierbei als Substanzen zum Studium der durch Opiode modulierten Signaltransmission. Als Vergleichsmodell wurde der isolierte Ductus deferens der Maus herangezogen, weil in diesem Gewebe zwar Opioidtoleranz, jedoch keine Abhängigkeit demonstriert werden kann. Darüber hinaus unterscheidet es sich durch das Fehlen neuronaler Somata grundsätzlich von der Plexus myentericus-Präparation. Dies bedeutet, daß Opioidrezeptoren im isolierten Ductus deferens allein an Nervenendigungen, also präsynaptisch, lokalisiert sein können.

Verschiedene experimentelle Befunde und theoretische Überlegungen deuten darauf hin, daß die Manifestation von Abhängigkeit einen intakten Rezeptorkoppelungsmechanismus voraussetzt. Ein Entzugssympton entsteht nur, wenn eine kontinuierliche Inhibition durch Opiode aufrechterhalten wird (Wüster et al., 1985). Es interessierte daher besonders, wie das irreversible Eingreifen der beiden Toxine in die Signalübermittlungsfunktion der G-Proteine Opioidabhängigkeit und Toleranz modifizieren kann.

Die hier dargestellten Versuche befassen sich mit der Wirkung von Choleratoxin und IAP auf rezeptorvermittelte inhibitorische und exzitatorische Funktionen nach in vivo- oder in vitro-Applikation dieser Toxine bei unbehandelten ("naiven") oder chronisch opioid-behandelten isolierten Organen (Plexus myentericus- und Ductus deferens-Präparate). Aus den Ergebnissen können Rückschlüsse auf die biochemischen Mechanismen von Opioidtoleranz und -abhängigkeit im peripheren Nervensystem gezogen werden.

2. METHODEN

2.1. Durchführung der Versuche

2.1.1. Präparation und Versuchsaufbau

Meerschweinchen wurde nach Dekapitation das Ileum entnommen und die Längsmuskulatur mit zugehörigem Plexus myentericus in Krebs-Ringerlösung nach der Methode von Rang (1964) präpariert. Dazu wurde der Darm über eine Glaspipette gezogen und zu beiden Seiten entlang des Mesenterialansatzes eingeritzt. Danach ließ sich die Längsmuskelschicht mit Hilfe von Wattestäbchen von der innenliegenden Zirkulärmuskulatur abtrennen. Der so gewonnene Gewebestreifen wurde in 4 cm lange Stücke geschnitten, die jeweils zu einer Schlaufe gelegt, mit einem Faden zusammengebunden und einzeln in Organbädern (Volumen: 5 ml) an einer hakenförmigen unteren Platinelektrode suspendiert wurden; oberhalb des Präparates befand sich jeweils eine zweite, ringförmige Stimulationselektrode. Die Krebs-Ringerlösung hatte folgende Zusammensetzung (mM): NaCl 118; KCl 4,75; CaCl₂ 2,54; KH₂PO₄ 1,19; MgSO₄ 1,20; NaHCO₃ 25; Glukose 11; Cholinchlorid 0,02. Im Organbad wurde die Ringerlösung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, um das Gewebe mit Sauerstoff zu versorgen und einen pH-Wert von 7,4 aufrechtzuerhalten. Eine Thermostat-Umwälzpumpe hielt die Temperatur des Mediums bei 37°C.

Die Präparate wurden durch elektrische Feldstimulation zu isometrischen Kontraktionen angeregt. Zur Erzielung maximaler Kontraktionen wurden Impulse mit folgenden Parametern gewählt: 60 V, 0,1 Hz, 0,5 ms (Goldstein und Schulz, 1973). Die Stärke der ausgelösten Kontraktionen wurde von Kraftaufnehmern registriert, mit denen die Präparate mittels eines Fadens verbunden waren; die Grundspannung wurde jeweils auf 1g eingestellt. Zur Aufzeichnung der Längsmuskelaktivität wurden die Kraftaufnehmer über Vorverstärker mit Zweikanalschreibern verbunden (Abb. 2).

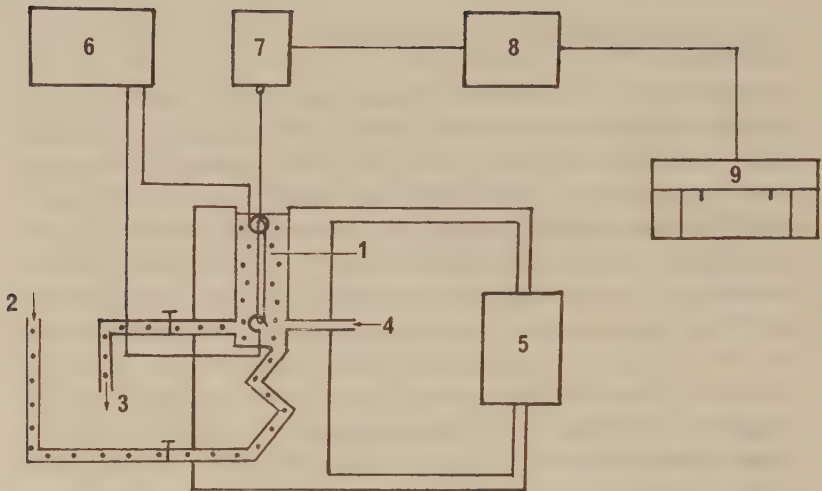


Abb. 2

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Organbad mit dem an einem Faden suspendierten Plexus myentericus-Längsmuskel- oder Ductus deferens-Präparat und zwei Stimulationselektroden (1), Zufluß (2) und Abfluß (3) der Ringerlösung, Carbogenzufuhr (4), Thermostat-Umwälzpumpe (5), Reizgerät (6), Kraftaufnehmer (7), Vorverstärker (8) und Zweikanalschreiber (9).

Die 2 cm langen Samenleiter wurden Mäusen nach Dekapitation entnommen. Die Samenflüssigkeit und anhaftendes Fettgewebe wurden entfernt. Während der Präparation und im Organbad wurden die Ductus deferentes in modifizierter Krebs-Ringerlösung folgender Zusammensetzung gehalten (mM): NaCl 118; KCl 4,75; CaCl_2 2,54; KH_2PO_4 0,93; NaHCO_3 25; Glukose 11; l-Tyrosin 0,25. Die sonstigen experimentellen Bedingungen (Abb. 2) und die Parameter für die elektrische Stimulation entsprachen denen der Plexus

myentericus-Längsmuskelpräparation.

2.1.2. Applikation der Testsubstanzen

Bevor inhibitorische und exzitatorische Funktionen untersucht werden konnten, benötigten die Präparate eine Equilibrationsphase, in der sich die Muskelkontraktionen als Reaktion auf die elektrische Stimulation stabilisierten: ca. 30 Minuten bei den Ductus deferentes, mindestens 60 Minuten bei den Plexus myentericus-Längsmuskelpräparaten. Währenddessen wurden sie in 5- bis 10-minütigen Intervallen gewaschen. Die Testsubstanzen wurden der Ringerlösung im Organbad mit Hamilton-Mikroliterspritzen zugegeben; die Lösungen der jeweiligen Substanzen waren so berechnet, daß zur Erzielung einer bestimmten Konzentration im Organbad nicht mehr als 1 bis 10 μ l der Lösung appliziert werden mußten, so daß die Volumenänderung vernachlässigt werden konnte.

Wenn exzitatorisch wirksame Substanzen, wie z.B. Neurotensin oder Serotonin, am Plexus myentericus-Präparat getestet werden sollten, geschah dies in Abwesenheit von elektrischer Stimulation. Diese Substanzen rufen eine tonische Muskelkontraktion hervor, deren Intensität in Prozent der vorausgehenden elektrisch stimulierten Kontraktionen ausgedrückt wurde. Die Wirkung inhibitorischer Pharmaka wurde definiert als die prozentuale Hemmung der elektrisch stimulierten Kontraktionen, die vor Applikation der Testdosis erreicht wurden. In anderen Versuchen wurden als Bezugsmaßstab chemisch, also durch exzitatorisch wirksame Substanzen, hervorgerufene Kontraktionen herangezogen, die ebenfalls durch Opioide oder andere am Plexus myentericus inhibitorisch wirkende Pharmaka dosisabhängig reduziert werden können.

Wenn die inhibitorischen oder exzitatorischen Testsubstanzen ihren maximalen Effekt erreicht hatten, wurden sie ausgewaschen, bevor die nächste Testdosis zugefügt werden

konnte. Bei der Plexus myentericus-Präparation vergingen in der Regel mindestens 10 bis 15 Minuten, bis die elektrisch stimulierten Kontraktionen wieder ihre Ausgangsgröße aufwiesen.

2.1.3. Induktion von Opioidtoleranz und -abhängigkeit

Um die Phänomene Opioidtoleranz und -abhängigkeit im Versuch am isolierten Organ zeigen zu können, ist die längerfristige in vivo-Zufuhr von Opioiden erforderlich. Dazu hat sich die Verwendung osmotischer Minipumpen als vorteilhaft erwiesen. Diese gewährleisten eine kontinuierliche, gleichbleibende Freisetzung des Wirkstoffes und damit einen konstanten Blutspiegel. Diese Technik ist wiederholten Injektionen des Pharmakons oder der Implantation von subkutanen Pellets vorzuziehen.

Die Minipumpe enthält ein Reservoir für die Wirkstofflösung aus undurchlässigem, komprimierbarem Material. Dieses ist von einem hypertonen Medium umgeben. Die äußere Umhüllung besteht aus einer starren semipermeablen Cellulose-Membran, die das Eindringen von Wasser ermöglicht, wenn sich die Pumpe in einem - gegenüber dem hypertonen Medium - hypotonen Milieu befindet, wie z.B. nach subkutaner Implantation. Hierdurch wird hydrostatischer Druck auf das Reservoir im Innern der Minipumpe ausgeübt, das entsprechend der zunehmenden Kompression die Wirkstofflösung über eine Kanüle freisetzt. Das hier verwendete Modell gab 1 μ l/h Wirkstofflösung über einen Zeitraum bis zu 8 Tagen ab (Abb. 3). Die subkutane Implantation der Minipumpen wurde in Äthernarkose vorgenommen. Durch einen kleinen Hautschnitt an der Flanke wurde eine subkutane Tasche vorgebildet. Nach Einführen der Minipumpe wurde der Hautschnitt mit Michelklammern verschlossen.

Zur Entwicklung von Opioidtoleranz und -abhängigkeit wurde Fentanyl, ein μ -Rezeptoragonist (Wüster et al., 1981), verwendet. Das Opioid wurde in Wasser gelöst und mittels

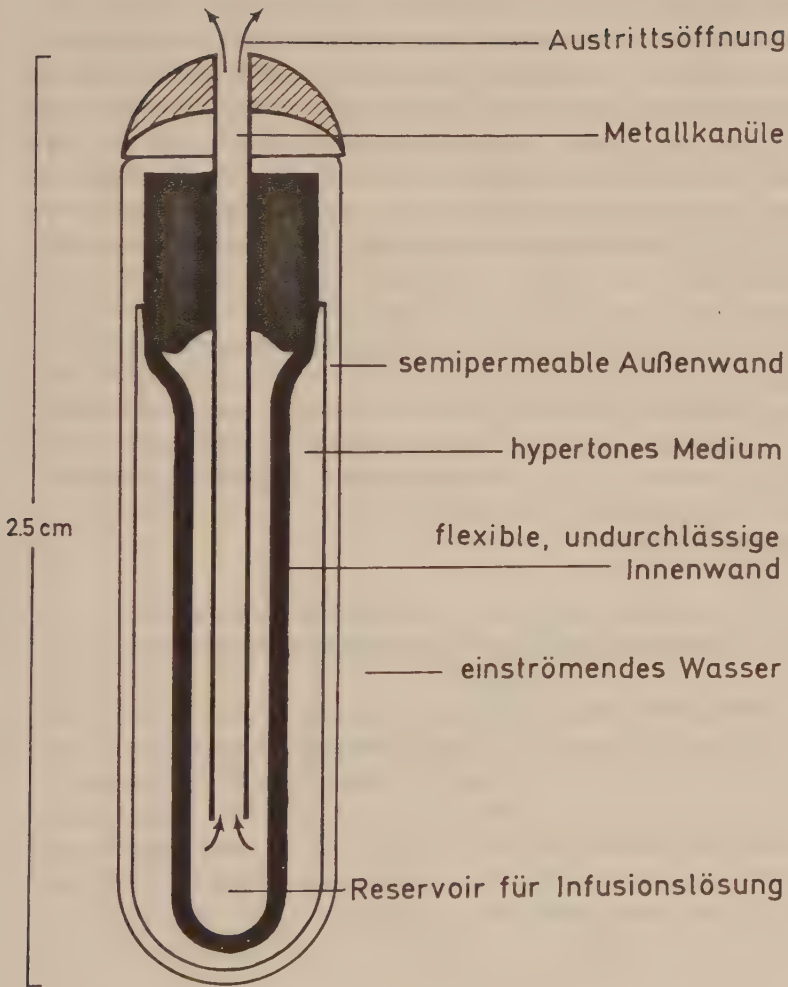


Abb. 3

Schnitt durch eine osmotische Minipumpe (Alza, Modell 2001; nähere Erläuterung im Text)

osmotischer Minipumpe in einer Dosis von 1 µg/h bzw. 10 µg/h für mehrere Tage infundiert. In vitro kann die Opioidabhängigkeit nur aufrechterhalten werden, wenn die Exposition mit dem Opioidagonisten kontinuierlich fortgesetzt wird. Ist dies nicht der Fall, manifestiert sich die Opioidabstinenz in einer Entzugskontraktion (Schulz und Herz, 1976a). Daher wurde der Ringerlösung während der Präparation und im Organbad Fentanyl in einer Konzentration von 2 nM zugesetzt. Unter diesen Bedingungen geht die in vivo aufgebaute Opioidabhängigkeit nicht verloren (Schulz et al., 1985). Entzugskontraktionen wurden in Abwesenheit von elektrischer Stimulation mit dem kompetitiven Opioidantagonisten Naloxon (100 nM) präzipitiert. Diese tonische Kontraktion wurde ebenfalls als Prozentwert der vorausgehenden elektrisch hervorgerufenen Kontraktionen angegeben. Auch die inhibitorische Wirkung des Agonisten Fentanyl (= Toleranzgrad) wurde bei diesen Präparaten in Anwesenheit der Inkubationskonzentration von 2 nM Fentanyl bestimmt.

2.1.4. Anwendung von Cholera- und Pertussistoxin

Die Exotoxine von *Bordetella pertussis* bzw. *Vibrio cholerae* wurden in Wasser gelöst (Cholera-toxin: 1 µg/µl; Pertussistoxin = IAP: 0,1 µg/µl) und bei +4° C gelagert. Beide Toxine sind Proteine, die aus mehreren nonkovalent gebundenen Untereinheiten aufgebaut sind, deren Konformation - und damit biologische Aktivität - durch Einfrieren ebenso wie durch Erwärmung zerstört wird (Gill, 1977; Tamura et al., 1982).

Cholera-toxin verursacht in vivo eine massive exsudative Entzündung am Ort der Applikation und wurde daher nur in orientierenden Versuchen intraperitoneal in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung injiziert bzw. mittels osmotischer Minipumpe (Abgabemenge 1 µg/h) subkutan infundiert. Vorwiegend wurde es jedoch in vitro angewendet, indem es der Ringerlösung im Organbad zugefügt wurde.

Während der Inkubationszeit wurden die Präparate nicht gewaschen, jedoch weiterhin elektrisch stimuliert.

Der Effekt von IAP wurde sowohl nach in vitro-Inkubation als auch nach einmaliger intraperitonealer Injektion untersucht. Meerschweinchen erhielten die jeweilige Toxindosis in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung, Mäuse in 0,1 ml injiziert. Gelegentlich wurde IAP ebenfalls mittels osmotischer Minipumpe zugeführt (Abgabemenge 0,1 µg/h). IAP rief keine sichtbaren Entzündungszeichen hervor.

2.2 Tiere, Substanzen, Geräte

Tiere: Meerschweinchen: Hartley, männlich, 300 bis 400 g,
Firma IWV, Gelting
Mäuse: N.M.R.I., männlich, 20 bis 30 g, IWV

Substanzen:

Fentanyl-Dihydrogencitrat: Janssen, Beerse, Belgien

Normorphin-Hydrochlorid: Bios-Products, Brüssel,
Belgien

Ethylketocyclazocin-Methansulfonat: Sterling-Winthrop, New York, USA

(D-Ala², D-Leu⁵)-Enkephalin,

β- Endorphin,

Neurotensin,

Corticotropin-releasing factor: Bachem, Bubendorf,
Schweiz

Naloxon-Hydrochlorid: Endo Labs, Garden City, N.J.
USA

Clonidin-Hydrochlorid: Boehringer, Ingelheim

Chloroadenosin,

Prostaglandin E₁,

l-Tyrosin: Sigma, Taufkirchen

Serotonin-Kreatininsulfat: Roth, Karlsruhe

Acetylcholin-Chlorid: Hoffmann-La Roche, Grenzach

Tetrodotoxin,

Choleratoxin: Calbiochem, La Jolla, Ca., USA
Islet-activating protein (= Pertussistoxin): List
Biological Laboratories, Campbell, Ca., USA

Die übrigen Substanzen wurden von der Firma E. Merck,
Darmstadt, bezogen.

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus einem Milli-Q-Reinstwasser-System angesetzt. Bei den Substanzverbindungen beziehen sich Konzentrationsangaben auf den reinen Wirkstoff. Alle Stammlösungen (mit Ausnahme der Toxine) wurden bei -18°C aufbewahrt. Peptidlösungen wurden während der Versuche in Eis gehalten.

Geräte, Hilfsmittel:

Versuchsaufbau (isolierte Organe):

Reizgerät: Farnell Physiological Stimulator, Dressler Elektronik, Berlin

Kraftaufnehmer: HBM Q 11, Hottinger Baldwin Meßtechnik, Darmstadt

Vorverstärker: KWS 3073, Hottinger Baldwin

Zweikanalschreiber: Kipp und Zonen, BD 41, Delft, Niederlande

Umwälzpumpe: Ultrathermostat K5, Colora, München

Sonstiges:

Osmotische Minipumpen: Modell 2001, Alza Corp., Palo Alto, Ca., USA

Mikroliterspritzen: Hamilton, Darmstadt

2.3. Auswertung und Statistik

Alle angegebenen Daten wurden aus Bestimmungen an minde-

stens 8 Präparaten von mindestens 3 verschiedenen Tieren gewonnen. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde einfach logarithmisches Papier verwendet. Auf der Ordinate wurde linear die prozentuale Hemmung oder Exzitation aufgetragen, wobei als Bezugsmaßstab, wie bereits erwähnt, die vorangegangenen elektrisch oder auch chemisch induzierten Kontraktionen dienten. Auf der Abszisse wurden in logarithmischer Form die molaren Konzentrationen der getesteten Substanzen angegeben. Ein häufig verwendeter Referenzwert für die Wirkung inhibitorischer Pharmaka am isolierten Organ ist die sog. IC_{50} , d.h. die Konzentration der jeweiligen Substanz, die eine 50-prozentige Hemmung der Kontraktionen bewirkt.

Aus den erhobenen Daten wurden Mittelwerte gebildet sowie die Standardfehler der Mittelwerte errechnet (S.E.M.). Für den Vergleich zweier Mittelwerte wurde der t-Test verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. In vitro-Exposition des Plexus myentericus-Längsmuskelpräparates des Meerschweinchenileums mit Cholera-toxin

3.1.1. Naive Präparate

Um zunächst sicherzustellen, daß Cholera-toxin die Funktion der glatten Muskulatur nicht beeinträchtigt und Effekte auf den Plexus myentericus beschränkt sind, wurde die Kontraktionskraft des Längsmuskels bei elektrischer Stimulation nach 3-stündiger in vitro-Inkubation mit Cholera-toxin (100 nM; "Standardkonzentration", s.u.) im Vergleich zu Kontrollpräparaten, die für die gleiche Zeitspanne nicht gewaschen worden waren, bestimmt. Es ergab sich für Cholera-toxin-behandelte Präparate ein Wert von $43 \pm 4,5$ mg pro mg Feuchtgewebe, für die Kontrollen $41 \pm 5,3$. Außerdem wurde die Reaktion der Präparate auf Acetylcholin, das direkt die Muskulatur stimuliert, getestet (Abb. 4). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Cholera-toxin-behandelten- und Kontrollpräparaten.

Es wurde geprüft, welche Wirkung Cholera-toxin an naiven, d.h. nicht opioidbehandelten Plexus myentericus-Präparaten, auf die exzitatorische Aktivität von Neurotensin (10 nM) ausübt. Die Kontraktion, die durch Neurotensin in dieser Konzentration ausgelöst wird, ist neuronalen Ursprungs, da sie durch Tetrodotoxin (200 nM), das die Fortleitung von Aktionspotentialen verhindert, vollständig eliminiert wurde. Die Präparate wurden mit Cholera-toxin (100 nM) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Reaktion auf Neurotensin getestet. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpräparaten, die auch nach 5 Stunden eine nur geringfügig reduzierte Reaktion auf das exzitatorische Neuropeptid zeigten, nahm die Empfindlichkeit der Cholera-toxin-behandelten Präparate stark ab. Dieser irreversible Effekt (s. 3.6.1.) setzte mit einer zeitlichen Verzögerung von über einer Stunde nach Zugabe des Toxins ein und er-

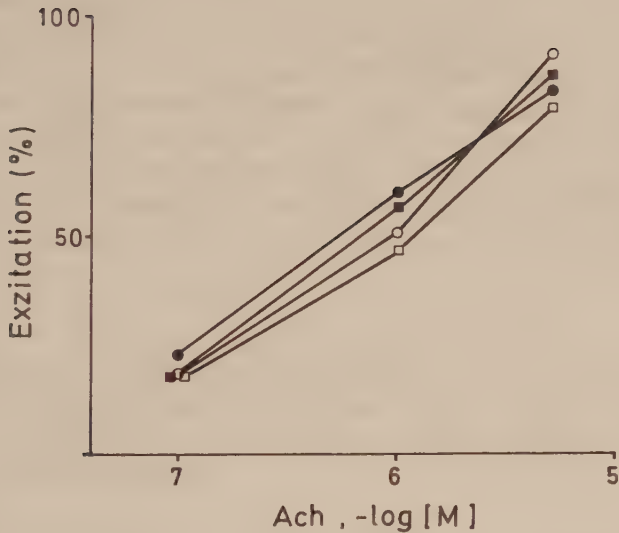


Abb. 4

Dosis-Wirkungskurven für Acetylcholin an Präparaten, die 3 Stunden in Anwesenheit von Cholera toxin (□, 100 nM) oder als unbehandelte Kontrollen (■) nicht gewaschen wurden bzw. an Präparaten von Tieren, die für 3 Tage eine einzelne Dosis IAP (○, 120 µg/kg i.p.) oder 0,9 %ige Kochsalzlösung (●, 0,5 ml i.p.) erhielten. Mittelwerte von mindestens 8 Bestimmungen. Die Standardfehler der Mittelwerte betrugen 10 bis 15% ($p > 0,05$).

reichte sein Maximum nach 3 bis 5 Stunden (Abb. 5). Der Zeitverlauf der Toxinwirkung auf die Aktivität anderer exzitatorischer Substanzen (Prostaglandin E_1 , 20 nM und Serotonin, 300 nM) war vergleichbar. Cholera toxin verliert seine spezifische Wirkung (s. 1.4.), wenn seine Proteinkonformation zerstört wird. Die Dissoziation der Untereinheiten und damit die Inaktivierung des Toxins wird durch größere pH-Verschiebungen, durch mehrmaliges Einfrieren oder durch Erwärmung über 50°C erreicht. In den hier dargestellten Versuchen (Abb. 5) wurden Präparate mit Chole-

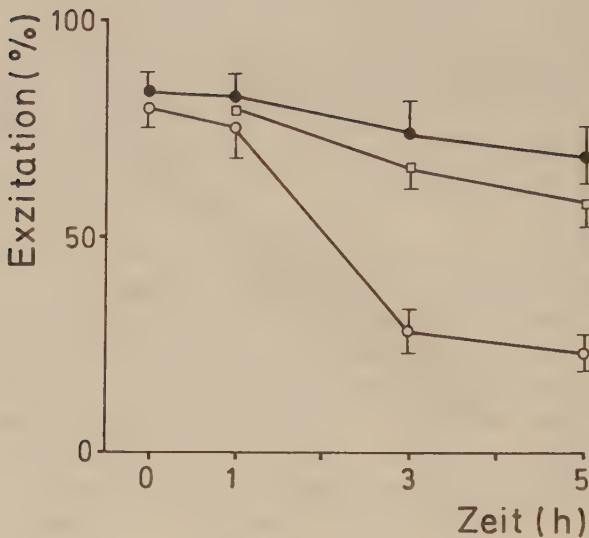


Abb. 5

Zeitverlauf der Wirkung von Cholera-toxin auf die exzitatorische Reaktion der Präparate auf Neurotensin (10 nM). Die Präparate wurden in Anwesenheit von Cholera-toxin (○, 100 nM), hitzeinaktiviertem Cholera-toxin (□, 100 nM) oder unter sonst gleichen Bedingungen in Abwesenheit von Toxin (●) gehalten.

Abszisse: Inkubationszeit in Stunden.

Ordinate: Exzitation in Prozent der vorangegangenen elektrisch stimulierten Kontraktionen.

Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von mindestens 8 Bestimmungen.

ratotoxin inkubiert, das im Wasserbad für 30 Minuten auf 60°C erhitzt worden war. Die Zeitverlaufskurve für die Reaktion auf Neurotensin (10 nM) nach Exposition mit hitzebehandeltem Cholera-toxin (100 nM) unterscheidet sich nicht signifikant von der für Kontrollpräparate ($p > 0,05$).

Abb. 6 zeigt den Effekt steigender Konzentrationen von Cholera-toxin bei einer konstanten Inkubationszeit von 3 Stunden. Als Testsubstanzen dienten Neurotensin (10 nM), Serotonin (300 nM) und Corticotropin-releasing factor (200 nM). Untersuchungen mit Tetrodotoxin (200 nM) ergaben, daß

diese exzitatorischen Substanzen in den verwendeten Konzentrationen am Plexus myentericus angreifen und keine direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur ausüben. Choleratoxin hemmte dosisabhängig die durch die genannten Substanzen hervorgerufenen Kontraktionen. Der Effekt von Choleratoxin (100 nM) konnte durch eine Verdoppelung der Inkubationskonzentration nicht nennenswert gesteigert werden. Die hier erhobenen Daten ließen für weitere Versuche eine Toxindosis von 100 nM und einen Expositionszeitraum von 3 Stunden als optimal erscheinen.

Tab. 1

Aktivität inhibitorisch wirkender Substanzen (IC_{50} -Werte, nM) an elektrisch stimulierten Plexus myentericus-Längsmuskelpräparaten nach Inkubation mit Choleratoxin (3 Stunden, 100 nM).

a) naive Präparate

Substanz	Kontrolle	Choleratoxin
Normorphin	200 $\pm$ 34	158 $\pm$ 50
Fentanyl	7,9 $\pm$ 1,7	9,5 $\pm$ 2,3
Clonidin	65 $\pm$ 18	69 $\pm$ 11
Chloroadenosin	147 $\pm$ 19	122 $\pm$ 10

b) chronisch opioidbehandelte Präparate (Fentanyl, 10 μ g/h, 6 Tage)

Substanz	Kontrolle	Choleratoxin
Fentanyl	33 $\pm$ 6,7	33 $\pm$ 4,6

Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von 10 bis 14 Bestimmungen. $p > 0,05$

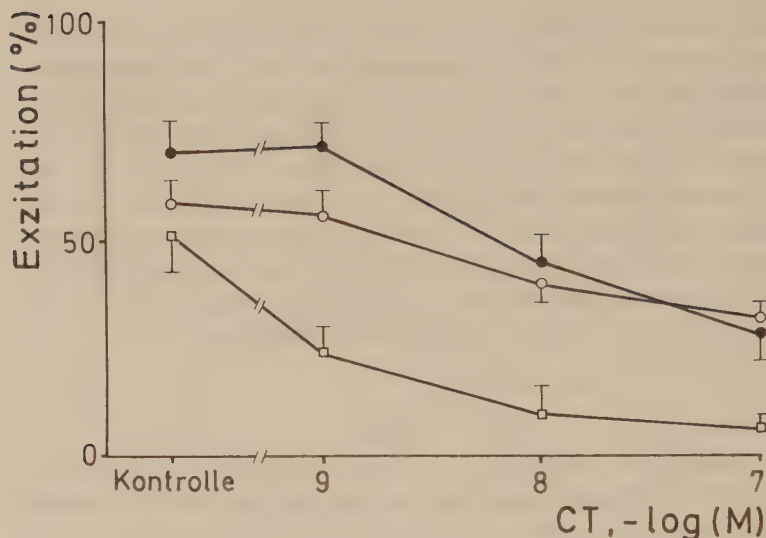


Abb. 6

Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Cholera toxin (Expositionszeit: 3 Stunden) auf die exzitatorische Reaktion der Präparate auf Neurotensin (●, 10 nM), Serotonin (○, 300 nM) und Corticotropin-releasing factor (□, 200 nM). Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von mindestens 12 Bestimmungen.

Tab. 1 demonstriert, daß inhibitorische Funktionen durch die Inkubation mit Cholera toxin nicht beeinflußt werden. Nach Toxinexposition wurden an elektrisch stimulierten Präparaten Dosis-Wirkungskurven für verschiedene Opioide und ebenfalls inhibitorisch wirkende Nicht-Opioide erstellt. Weder die IC_{50} -Werte (Tab. 1) noch die maximal erreichbaren Hemmungen zeigten im Vergleich zu Kontrollpräparaten Veränderungen.

3.1.2. Opioidabhängige Präparate

Die folgenden Versuche wurden an Präparaten von Meerschweinchen ausgeführt, denen mittels osmotischer Minipumpen über 6 Tage Fentanyl (10 μ g/h) zugeführt worden

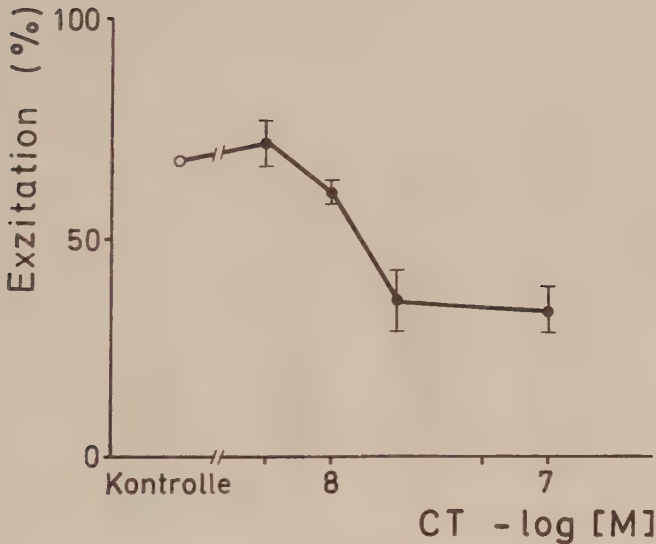


Abb. 7

Dosisabhängigkeit der Wirkung von Cholera toxin (Expositionszeit: 3 Stunden) auf durch Naloxon (100 nM) ausgelöste Entzugskontraktionen bei opioidabhängigen Präparaten von Meerschweinchen nach 6-tägiger Fentanylbehandlung (10 µg/h).

Fentanylkonzentration in vitro: 2 nM.

Mittelwerte (+ S.E.M.) von mindestens 12 Bestimmungen.

war. In vitro wurde eine Fentanylkonzentration von 2 nM aufrechterhalten. Cholera toxin wurde - dem Vorgehen bei naiven Präparaten entsprechend - für 3 Stunden bei fortgesetzter elektrischer Stimulation der Ringerlösung zugesetzt; die Präparate wurden in dieser Zeit nicht gewaschen. Anschließend wurden Entzugskontraktionen in Abwesenheit elektrischer Stimulation durch Naloxon (100 nM) ausgelöst. Cholera toxin bewirkte eine dosisabhängige Abschwächung der Entzugskontraktion (Abb. 7), deren Maximum, eine Reduktion um 50 bis 60 %, durch eine Toxinkonzentration von 100 nM erreicht wurde. Cholera toxin beeinträchtigte die exzitatorische Wirkung von Neurotensin (10 nM)

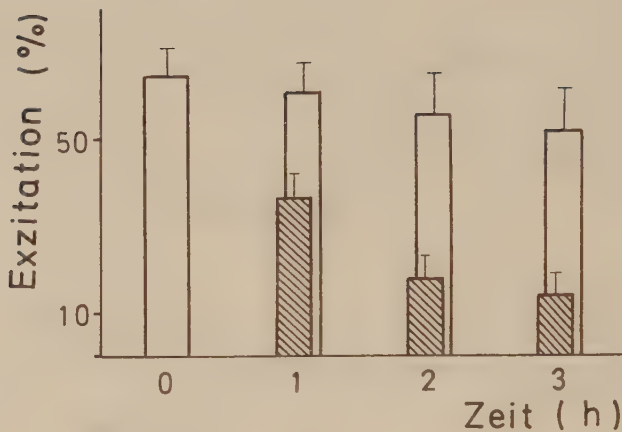


Abb. 8

Zeitverlauf der Wirkung von Cholera-toxin (100 nM, schraffierte Säulen) auf Entzugskontraktionen, die durch Naloxon (100 nM) ausgelöst wurden. Die Meerschweinchen hatten 6 Tage Fentanyl (10 µg/h) erhalten. Die Präparate wurden in Abwesenheit von Fentanyl für 1 bis 3 Stunden mit Cholera-toxin inkubiert und anschließend über 90 Minuten unter Zugabe von Fentanyl (2 nM) gewaschen. Kontrollpräparate unterlagen ohne Toxinexposition den gleichen Bedingungen (offene Säulen). Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von 8 bis 12 Bestimmungen.

an diesen opioidabhängigen, nicht entzogenen Präparaten im gleichen Ausmaß, wie es an naiven Präparaten beobachtet wurde.

Bei der Prüfung des Toleranzgrades gegenüber dem in vivo zugeführten Opioidagonisten Fentanyl an elektrisch stimulierten Präparaten ließ sich kein Unterschied zur Opioidempfindlichkeit von Kontrollpräparaten feststellen (Tab. 1,b).

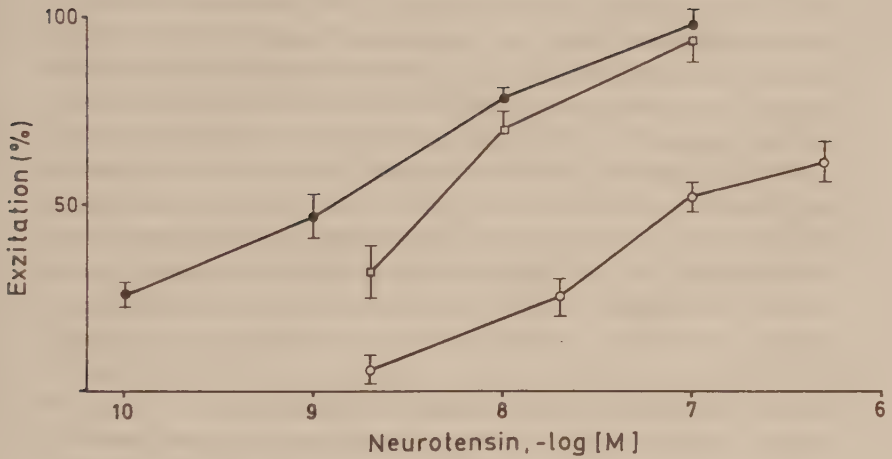


Abb. 9

Dosis-Wirkungskurven für Neurotensin nach Cholera-Toxin-Zufuhr mittels osmotischer Minipumpe (1 $\mu\text{g/h}$) für 2 Tage (□) bzw. 5 Tage (○). Kontrollpräparate stammten von Tieren, die in osmotischen Minipumpen 0,9 %ige Kochsalzlösung (●, 1 $\mu\text{l/h}$) erhalten hatten. Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von 6 bis 8 Bestimmungen.

Abb. 8 zeigt den Zeitverlauf der Toxinwirkung bei opioid-abhängigen Präparaten. Die Hemmung der Entzugs-kontraktionen durch Cholera-Toxin (100 nM) in Relation zur Kontraktion bei Kontrollpräparaten ist hier etwas stärker als es in Abb. 7 für die gleiche Toxindosis bei einer 3-stündigen Exposition dargestellt wurde. Dies läßt sich durch die modifizierten Versuchsbedingungen bei der Erstellung der Zeitverlaufskurve begründen. Es sollte untersucht werden, ob die Intensität der Wirkung von Cholera-Toxin durch Inkubation unter Entzugsbedingungen und anschließender Reinkubation mit dem Opioidagonisten beeinflußt würde. Durch die schlechte Verträglichkeit von Cholera-Toxin in vivo (exsu-

dative Entzündung) existierte kein geeignetes Verfahren, um das Toxin in größerer Menge auch schon vor der Applikation des Opioids und somit vor der Entwicklung von Abhängigkeit zuzuführen und eventuell eine stärkere Hemmung der Entzugskontraktion zu erzielen. Daher wurde auf die im folgenden beschriebene in vitro-Methode zurückgegriffen. Dabei wurde der Agonist, Fentanyl, nach dem Verbringen der Präparate in die Organbäder über einen Zeitraum von 60 Minuten ausgewaschen, um den Zustand der Opioidabhängigkeit zu "beseitigen", bevor Choleratoxin (100 nM) zugegeben wurde. Nach der jeweiligen Inkubationsphase (ohne Wechsel des Ringermediums) wurden die Präparate über 90 Minuten hinweg in 5- bis 10-minütigen Intervallen gewaschen und dabei Fentanyl (2 nM) zugesetzt, so daß Opioidtoleranz und -abhängigkeit in vitro wiederaufgebaut werden konnten. Danach wurden Entzugskontraktionen mit Naloxon präzipitiert. Durch diesen experimentellen Ansatz verringerten sich sowohl die Entzugskontraktionen der Kontrollpräparate, die in Abwesenheit von Choleratoxin dem gleichen procedere unterworfen waren, als auch, allerdings in stärkerem Ausmaß, die der Choleratoxin-behandelten Präparate. Zu den in Abb. 8 angegebenen Stunden der reinen "Inkubationszeit" müssen die 90 Minuten der Reinkubation mit Fentanyl addiert werden, da Choleratoxin nicht ausgewaschen werden kann, sondern in dieser Zeit irreversibel gebunden bleibt (s. 3.6.1.).

Damit erweist sich, daß ein maximaler Effekt bei opioid-abhängigen Präparaten nach 3 Stunden eintritt: der gleiche Zeitraum, der auch für die Reduktion exzitatorischer Funktionen bei naiven Präparaten benötigt wurde.

3.2. Neuronale Funktionen des isolierten Organs nach in vivo-Behandlung von Meerschweinchen mit Choleratoxin

Choleratoxin entfaltete seine spezifische Wirkung nicht nur bei in vitro-Anwendung. Abb. 9 veranschaulicht, daß das Toxin auch bei subkutaner Applikation mittels osmoti-

scher Minipumpe seinen Wirkort erreicht und die gleiche Desensitivierung gegenüber exzitatorischen Substanzen bewirkt wie sie nach in vitro-Behandlung beobachtet werden kann. Wegen der entzündlichen Reaktionen auf das Toxin war eine relativ kleine Abgabemenge von 1 µg/h gewählt worden. Bei dieser Dosis zeigte sich nach 2 Tagen noch kein signifikanter Effekt gegenüber Kontrollpräparaten von Tieren, die Minipumpen mit physiologischer Kochsalzlösung erhalten hatten. Nach 5-tägiger Zufuhr hatte sich jedoch die Dosis-Wirkungskurve für Neurotensin beträchtlich (Faktor 50) nach rechts verschoben (Abb. 9). Inhibitorische Mechanismen wurden dagegen nicht beeinflusst: die IC_{50} für Normorphin betrug für Cholera-toxin-exponierte- und Kontrollpräparate jeweils 300 nM.

Bei einer einmaligen intraperitonealen Injektion einer größeren Menge Cholera-toxin (50 µg) stellte sich der typische Effekt auf die exzitatorischen Funktionen bereits nach 12 Stunden ein. Durch den gleichen Behandlungsmodus konnte bei Präparaten von einem opioidabhängigen Meerschweinchen (Fentanyl, 10 µg/h, 3 Tage) eine Reduktion der Entzugskontraktion im gleichen Ausmaß wie nach mehrstündiger Inkubation erzielt werden.

Es wurde darauf verzichtet, Zeit- und Dosisabhängigkeit der in vivo-Effekte eingehender zu studieren, da sich auch bei kleinen Toxinmengen eine starke Entzündung am Ort der Applikation entwickelte. Prinzipiell scheint jedoch kein Unterschied in der spezifischen Wirksamkeit von Cholera-toxin nach in vitro- oder in vivo-Anwendung zu bestehen.

3.3. In vitro-Exposition des Plexus myentericus-Längsmuskelpräparates mit Pertussistoxin

In Analogie zu den Versuchen mit Cholera-toxin, wodurch in vitro bei mehrstündiger Einwirkungszeit sowohl bei naiven als auch bei opioid-abhängigen Präparaten eindeutig hemmende Effekte auf exzitatorische Funktionen erzielt werden

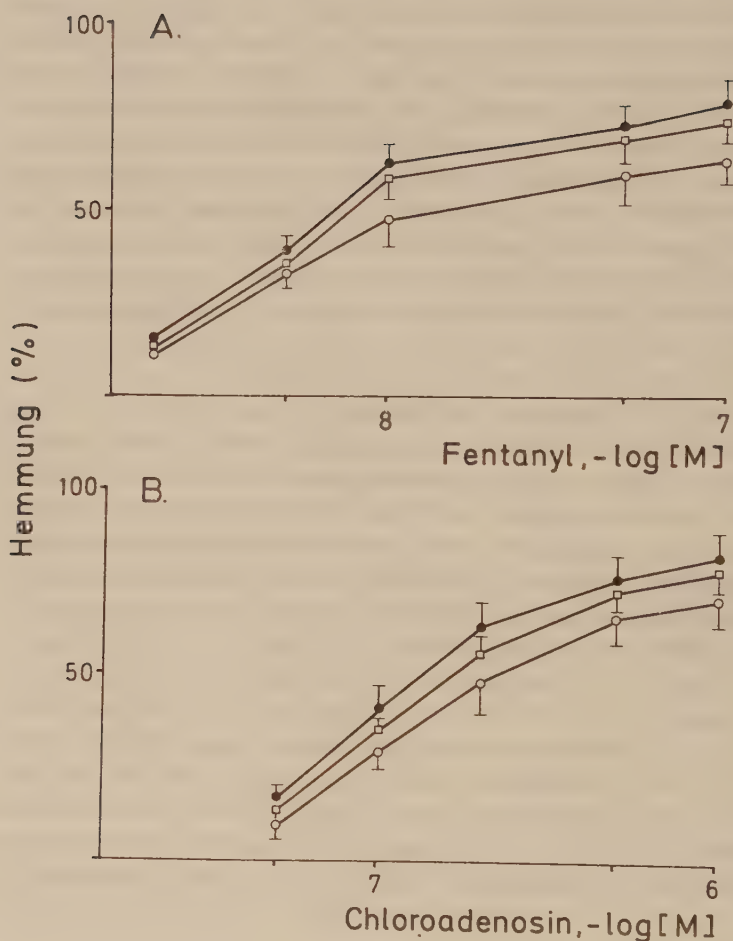


Abb. 10

Dosis-Wirkungskurven für Fentanyl (A) und Chloroadenosin (B) nach einer einmaligen Injektion von 120 µg/kg (○) bzw. 60 µg/kg (□) IAP 6 Tage vor dem Versuch. Kontrollpräparate (●) stammten von Tieren, die zum gleichen Zeitpunkt 0,9 %ige Kochsalzlösung i.p. erhalten hatten. Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von 10 bis 12 Bestimmungen.

konnten, wurde in orientierenden Experimenten zunächst auch Pertussistoxin (IAP) im Organbad dem Ringermedium zugesetzt. Naive Präparate wurden mit 0,5 bzw. 2 μg IAP pro ml Ringerlösung für 3 Stunden, andere mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 7 Stunden inkubiert. Kontrollpräparate blieben unter sonst gleichen Bedingungen ohne Toxinexposition. Nach den genannten Zeiträumen wurde die Hemmung der elektrisch induzierten Kontraktionen durch Fentanyl und die exzitatorische Reaktion auf Prostaglandin E_1 geprüft. Auch nach einer Expositionszeit von 7 Stunden waren keine Unterschiede zu Kontrollpräparaten festzustellen: die IC_{50} für Fentanyl betrug für IAP-behandelte Präparate 7,6 nM (n=4), für Kontrollen 10,9 nM (n=6), das Ausmaß der PGE_1 -bedingten Kontraktionen (20 nM) erreichte bei IAP-Präparaten 59%, bei den Kontrollen 64%.

Weiterhin wurde in vitro untersucht, ob Pertussistoxin mit Mechanismen von Opioidtoleranz und -abhängigkeit interferieren kann. Präparate von Meerschweinchen, die 3 Tage mit Fentanyl (10 $\mu\text{g}/\text{h}$) behandelt worden waren und in vitro weiterhin das Opioid in einer Konzentration von 2 nM erhielten, wurden 3 Stunden mit IAP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Anschließend lag die Stärke der durch Naloxon präzipitierten Entzugskontraktionen für IAP-exponierte Präparate bei 68% (n=4) und für Kontrollen im gleichen Bereich, nämlich 76% (n=8). Aus Kostengründen wurde nicht versucht, IAP in höheren Inkubationsdosierungen anzuwenden.

3.4. Neuronale Funktionen des isolierten Organs nach in vivo-Behandlung von Meerschweinchen mit Pertussistoxin

3.4.1. Naive Präparate

Von naiven, d.h. nicht opioidbehandelten, Meerschweinchen wurden 3 bzw. 6 Tage nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion mit IAP Präparate entnommen und in vitro die Reaktion auf inhibitorische und exzitatorische Sub-

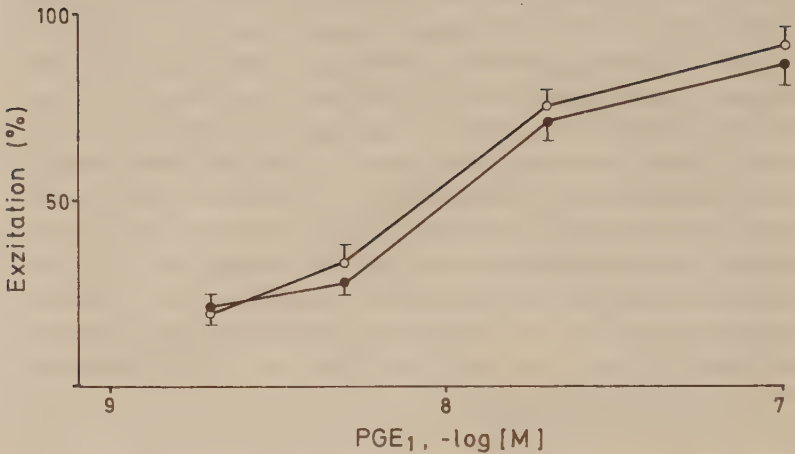


Abb. 11

Exzitatorische Reaktion auf Prostaglandin E₁ nach einer Injektion von IAP (0, 120 µg/kg i.p.) 3 Tage vor der Dekapitation; Kontrollpräparate (●) wurden Tieren entnommen, die 0,9 %ige Kochsalzlösung i.p. erhalten hatten. Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von 8 bis 10 Bestimmungen.

stanzen geprüft. In Anlehnung an die in neueren Arbeiten angegebenen Dosisbereiche für IAP-Effekte am Plexus myentericus des Meerschweinchens (Lujan et al., 1984; Tucker, 1984) waren Dosierungen von 20, 60 und 120 µg/kg Körpergewicht gewählt worden. Abb. 10 zeigt Dosis-Wirkungskurven für die Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen durch den µ-Rezeptoragonisten Fentanyl und das ebenfalls inhibitorisch wirkende Nicht-Opioid Chloroadenosin. Die Präparate stammten von Tieren, die 6 Tage vor der Dekapitation eine einmalige Injektion (i.p.) von 60 bzw. 120 µg/kg IAP erhalten hatten. Insbesondere für die maximale Dosis von 120 µg/kg ergibt sich eine leichte Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven, d.h. die IC₅₀ für die jeweilige Substanz ist bei dieser Toxinmenge, die allerdings in

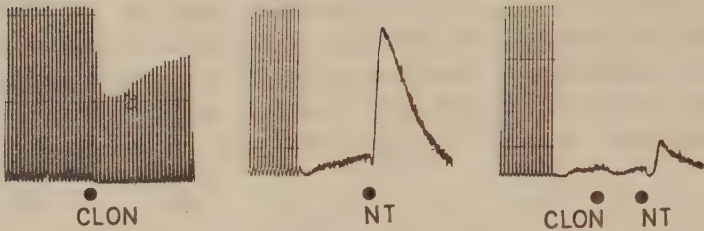
späteren Versuchen weit unterschritten wurde, um das 2-fache erhöht ($p < 0,05$). Bei IAP-Dosierungen von 20 bzw. 60 $\mu\text{g/kg}$ (Abb. 10) ist keine signifikante Verschiebung zu beobachten. Für einen Einwirkungszeitraum von 3 Tagen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Als zusätzliches Opioid wurde der κ -Rezeptoragonist Ethylketocyclazocine getestet; die dafür erstellten Dosis-Wirkungskurven verhielten sich ähnlich denen für Fentanyl und Chloroadenosin.

Die Kontraktionskraft der glatten Muskulatur wird durch die IAP-Behandlung nicht tangiert. Die Reaktion auf Acetylcholin bleibt gegenüber den Kontrollen unverändert (Abb. 4). Nach einer einmaligen i.p.-Injektion mit IAP (120 $\mu\text{g/kg}$) zeigten die nach 3 Tagen entnommenen Längsmuskelpräparate eine Kontraktionskraft von $51 \pm 4,0$, die Kontrollpräparate (0,9 %ige Kochsalzlösung i.p.) $55 \pm 4,2$ mg pro mg Feuchtgewebe.

Zur Prüfung exzitatorischer Funktionen neuronalen Ursprungs wurden PGE_1 und Neurotensin verwendet. Diese Substanzen wurden jeweils in Abwesenheit von elektrischer Stimulation zugegeben. Nach 3-tägiger Behandlung mit der angewendeten Maximaldosis von IAP zeigte sich für PGE_1 die gleiche exzitatorische Aktivität wie bei Kontrollpräparaten (Abb. 11). Für Neurotensin ergab sich ebenfalls kein Unterschied zwischen IAP-behandelten- und Kontrollpräparaten (s. Tab. 2).

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß IAP an der Plexus myentericus-Präparation exzitatorische Mechanismen nicht beeinflußt, aber auch die Inhibition elektrisch ausgelöster Kontraktionen nicht beeinträchtigt (Abb. 10), wurde nach Methoden gesucht, inhibitorische Vorgänge entsprechend ihrer möglicherweise unterschiedlichen neuro-anatomischen Lokalisation zu differenzieren. Zu diesem Zweck wurde für verschiedene Opiode und Nicht-Opiode das Ausmaß der Hemmung von elektrisch und "chemisch" induzierten Kontraktionen verglichen. Letztere lassen sich in ih-

A.



B.

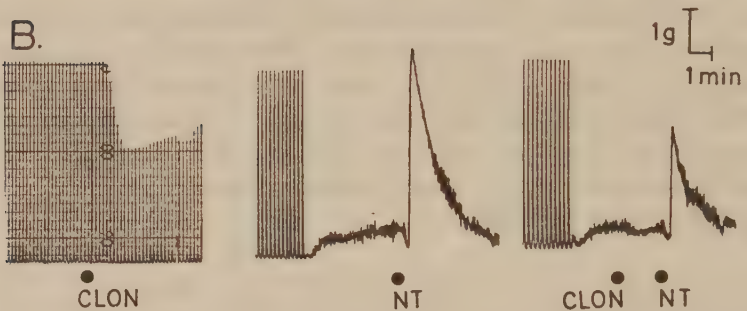


Abb. 12

Hemmende Wirkung von Clonidin (1000 nM) auf elektrisch und "chemisch" (Neurotensin, 10 nM) induzierte Kontraktionen bei unbehandelten Präparaten (A) und bei Präparaten von Tieren, die 3 Tage vor der Dekapitation IAP (5 μ g/kg) erhalten hatten (B).

CLON=Clonidin; NT=Neurotensin

rer Entstehung vermutlich dem neuronalen Soma zuordnen. Sie wurden (in Abwesenheit von elektrischer Stimulation) mit Neurotensin (10 nM) hervorgerufen und erreichten ca. 80% des Ausmaßes der elektrisch ausgelösten Kontraktionen (in diesem Dosisbereich kann sicher davon ausgegangen werden, daß die Exzitation rein neuronalen Ursprungs ist; s. 3.1.1.). Die inhibitorischen Testsubstanzen wurden 2 bis 4 Minuten vor Zugabe von Neurotensin appliziert. Auf diese Weise wurden für Normorphin, Fentanyl und Chloroadenosin

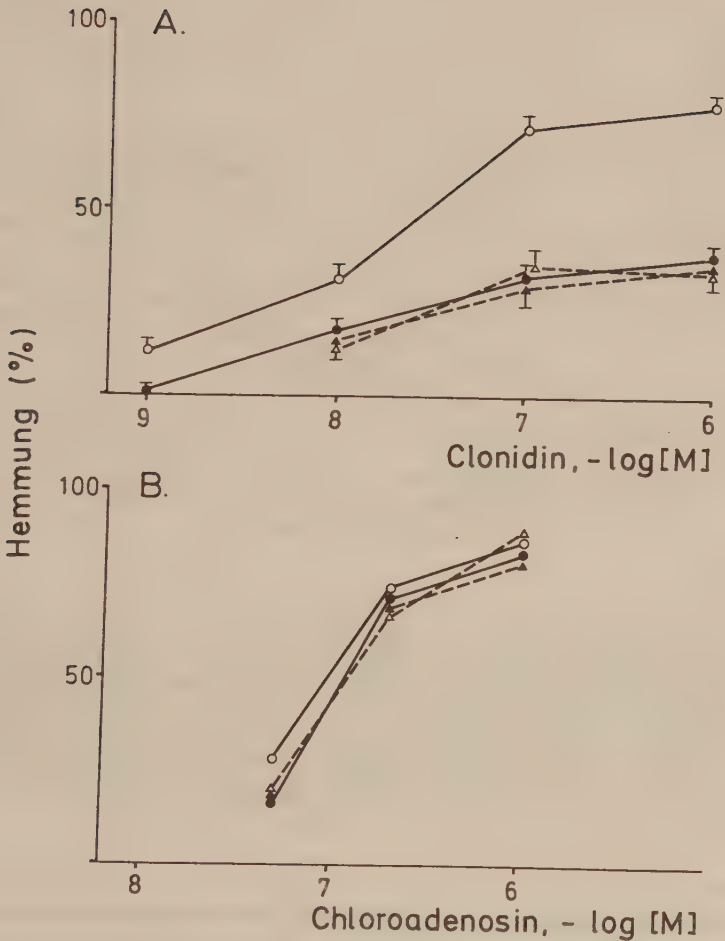


Abb. 13

Dosis-Wirkungskurven für die Hemmung elektrisch (gefüllte Symbole) und "chemisch" (offene Symbole) induzierter Kontraktionen durch Clonidin (A) und Chloroadenosin (B) bei Präparaten von Meerschweinchen, die 3 Tage vor dem Versuch IAP (▲, gestrichelte Linien; 5 µg/kg i.p.) oder 0,9 %ige Kochsalzlösung i.p. (●○, durchgezogene Linien) erhalten hatten.

Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von mindestens 12 Bestimmungen.

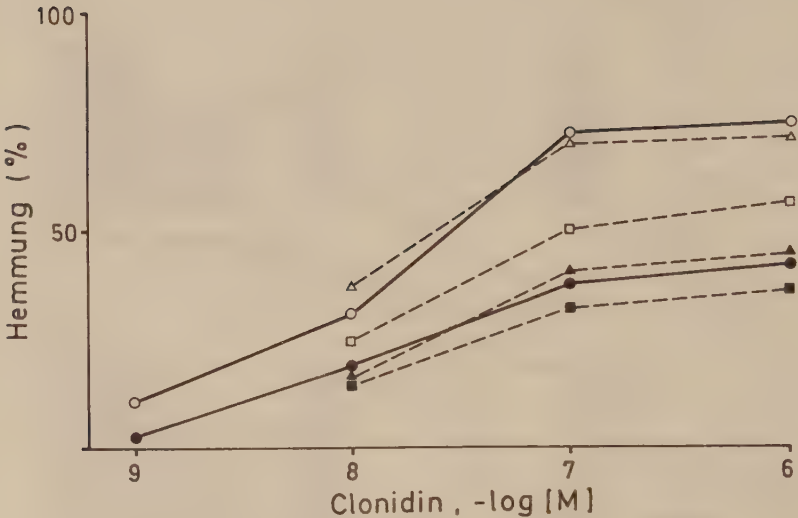


Abb. 14

Hemmung elektrisch (gefüllte Symbole) und "chemisch" (offene Symbole) induzierter Kontraktionen durch Clonidin bei IAP-behandelten- (gestrichelte Linien) und Kontrollpräparaten (●○, durchgezogene Linien). Die Tiere waren 3 Tage nach einer einzelnen i.p.-Injektion von 0,5 (■□) bzw. 0,05 (▲△) µg/kg IAP dekapitiert worden.

Mittelwerte von mindestens 8 Bestimmungen. Die Standardfehler der Mittelwerte betrugen max. 15%.

Dosis-Wirkungskurven hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf Neurotensin-bedingte Exzitation erstellt. Diese Substanzen zeigten keinen Unterschied in ihrer inhibitorischen Potenz bei elektrisch und chemisch induzierten Kontraktionen. Abb. 13 (B) zeigt als Beispiel die Dosis-Wirkungskurven für Chloroadenosin: die IC_{50} beträgt jeweils ca. 100 nM.

Unterschiede wurden hingegen bei Clonidin beobachtet (Abb. 13 A). Clonidin hemmt elektrisch stimulierte Kontraktionen nur schwach, selbst bei 1000 nM läßt sich in der Regel

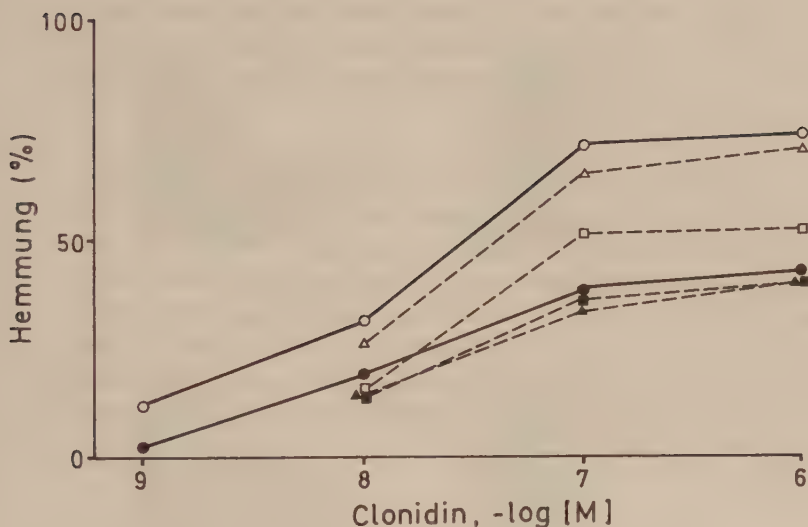


Abb. 15

Hemmung elektrisch (gefüllte Symbole) und "chemisch" (offene Symbole) induzierter Kontraktionen durch Clonidin bei IAP-behandelten- (gestrichelte Linien) und Kontrollpräparaten (●○, durchgezogene Linien). Die Tiere hatten eine einzelne IAP-Dosis (20 µg/kg i.p.) 3 Stunden (■□) bzw. 12 Tage (▲△) vor der Dekapitation erhalten.

Mittelwerte von mindestens 8 Bestimmungen. Die Standardfehler der Mittelwerte betrugen max. 15%.

keine 50-prozentige Hemmung erzielen. Demgegenüber liegt die IC_{50} für die Hemmung Neurotensin-induzierter Kontraktionen bei nur 30 nM. Diese α_2 -adrenerge Substanz wurde daraufhin nach der beschriebenen Methode an Präparationen von IAP-behandelten Meerschweinchen getestet (Abb. 12, 13 A). Die Tiere hatten 3 Tage vor dem Versuch 120, 20 oder 5 µg/kg IAP (i.p.) erhalten. Aus Abb. 13 (A) ist ersichtlich, daß IAP die hohe Empfindlichkeit der Neurotensin-induzierten Kontraktionen für die Wirkung von Clonidin beseitigt und die resultierende Dosis-Wirkungskurve identisch mit der für Hemmung elektrischer Stimulation verläuft.

Chloroadenosin (Abb. 13 B) und Opiode hemmen elektrisch und chemisch stimulierte Kontraktionen mit gleicher Intensität, d.h. die beiden Dosis-Wirkungskurven überlagern sich. Ein möglicher IAP-Effekt kann daher hier nicht "sichtbar" gemacht werden.

Die Abbildungen 14 und 15 demonstrieren Dosisabhängigkeit und Zeitverlauf der IAP-Wirkung auf die Inhibition chemisch stimulierter Exzitationen. Wie aus Abb. 13 (A) bereits hervorging, reicht eine einmalige Dosis von 5 µg/kg aus, um die Hemmung der Neurotensin-bedingten Kontraktion durch Clonidin aufzuheben. Sogar die Injektion von 0,5 µg/kg führt noch zu einer deutlichen Verminderung der Hemmung (Abb. 14; $p < 0,05$). Die zehnfach niedrigere Dosis erzielt keinen Effekt mehr.

Tab. 2

Reaktion auf Neurotensin (10 nM; Prozent der elektrisch stimulierten Kontraktionen) nach unterschiedlichen IAP-Dosierungen (i.p.-Injektion 3 Tage vor der Dekapitation).

IAP (µg/kg)	% Kontraktion
0 ¹	82 ± 2,5
0,5	81 ± 3,0
5	87 ± 3,7
20	81 ± 2,4
120	85 ± 4,3

Mittelwerte (+ S.E.M.) von mindestens 8 Bestimmungen ($p > 0,05$).
¹ 0,9% NaCl

Die Wirkung von IAP setzt relativ rasch ein. Schon 3 Stunden nach einer i.p.-Injektion von IAP (20 µg/kg) wurde die Hemmung der chemisch ausgelösten Kontraktionen signifikant reduziert (Abb. 15; $p < 0,05$). Die Dosis-Wirkungskurven für eine Einwirkungszeit von 24 Stunden bzw. 3 Tagen (20 µg/kg) unterscheiden sich nicht von den in Abb. 13 (A)

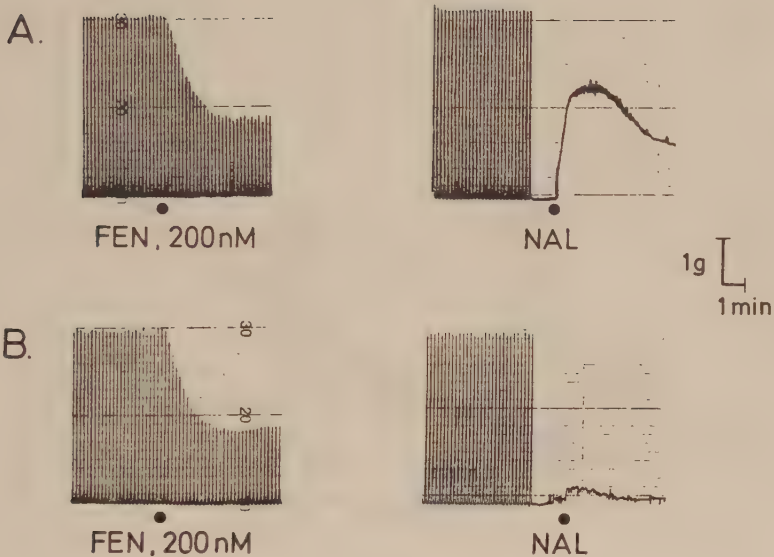


Abb. 16

Inhibitorische Wirkung von Fentanyl (200 nM) und Ausmaß der durch Naloxon (100 nM) hervorgerufenen Entzugskontraktionen bei Präparaten von Tieren, die 6 Tage vor der Dekapitation 0,9 %ige Kochsalzlösung i.p. (A) bzw. IAP (B; 120 µg/kg i.p.) erhalten hatten. Allen Tieren war vor dem Versuch für 3 Tage Fentanyl (1 µg/h) zugeführt worden. Fentanylkonzentration in vitro: 2 nM.

dargestellten Kurven. Nach 12 Tagen war die Wirkung einer einmaligen IAP-Injektion abgeklungen. Es genügen demnach relativ geringe Mengen IAP und eine Einwirkungszeit von wenigen Stunden, um den vollständigen Effekt auf die beschriebenen inhibitorischen Funktionen an der Plexus myentericus-Präparation hervorzurufen. Auch die Anwendung einer osmotischen Minipumpe (subkutane Implantation), die für 5 Tage 0,1 µg IAP pro Stunde freisetzte, führte zum gleichen Effekt.

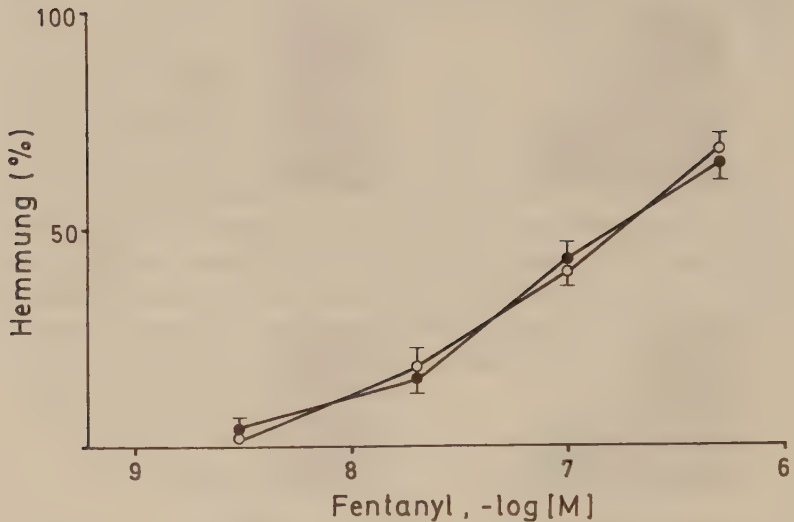


Abb. 17

Dosis-Wirkungskurven für Fentanyl an Präparaten von Tieren, denen 3 Tage vor dem Versuch IAP (O, 120 μ g/kg) bzw. 0,9 %ige Kochsalzlösung (●) i.p. injiziert wurden. Die Fentanylexposition vor der Dekapitation dauerte bei allen Tieren 2 Tage.

Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von 8 bis 10 Bestimmungen.

Es wurde bereits auf Befunde hingewiesen, nach denen IAP keine Veränderung exzitatorischer Mechanismen bewirkt (Abb. 11). Da für die hier beschriebenen Versuche die Reaktion der Präparate auf Neurotensin (10 nM) als Bezugsmaßstab herangezogen wurde, soll nochmals betont werden, daß die durch dieses Neuropeptid ausgelösten Kontraktionen bei IAP-behandelten- und Kontrollpräparaten im Ausmaß nicht differierten (Tab. 2).

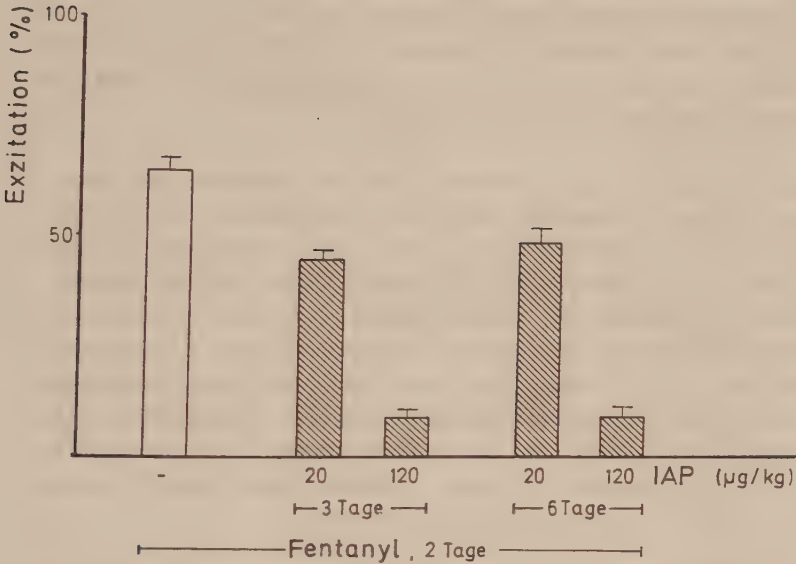


Abb. 18

Wirkung von verschiedenen IAP-Dosierungen und -Einwirkungszeiten (schraffierte Säulen) auf Entzugskontraktionen nach 2-tägiger Fentanylexposition (1 µg/h). Kontrollpräparate (offene Säule) stammten von Tieren, denen vor der Fentanylzufuhr 0,9 %ige Kochsalzlösung i.p. verabreicht worden war.

Mittelwerte (+ S.E.M.) von mindestens 12 Bestimmungen.

3.4.2. Opioidabhängige Präparate

Nachdem sich gezeigt hatte, daß IAP an naiven, d.h. nicht opioidbehandelten, Plexus myentericus-Präparaten bestimmte akute inhibitorische Mechanismen nachhaltig blockieren kann, sollte geprüft werden, ob auch Mechanismen bei chronischer Aktivierung von Opioidrezeptoren durch das Toxin beeinflusst werden könnten. Zu diesem Zweck wurde Meeresschweinchen 3 Tage nach einer einzelnen i.p.-Injektion mit IAP (120 µg/kg) eine osmotische Minipumpe implantiert, die Fentanyl (1 µg/h) abgab. Nach weiteren 3 Tagen wurden die

Präparate gewonnen und der Grad an Opioidtoleranz und -abhängigkeit bestimmt. Das Ergebnis wird durch Abb. 16 veranschaulicht: die durch Naloxon (100 nM) ausgelöste Entzugskontraktion wurde durch die Vorbehandlung mit IAP (120 µg/kg) fast vollständig eliminiert.

Interessanterweise veränderte sich der Toleranzgrad gegenüber Fentanyl (Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen) jedoch nicht. Die IC_{50} lag jeweils bei ca. 200 nM (Abb. 17). (Es darf nicht verwundern, daß die hier angegebenen IC_{50} -Werte für Fentanyl bei toleranten Präparaten erheblich von den Werten der Versuchsreihe mit Cholera-toxin (s. 3.1.2.) abweichen. Die Versuche wurden in einem zeitlichen Abstand von mehreren Monaten durchgeführt. Es ist bekannt, daß es bei isolierten Organen zu jahreszeitlichen Schwankungen in der Opioidempfindlichkeit kommen kann (de Ceballos und de Felipe, 1984)).

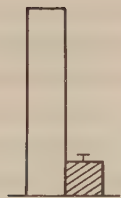
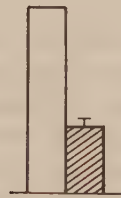
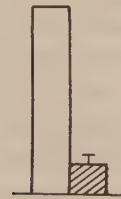
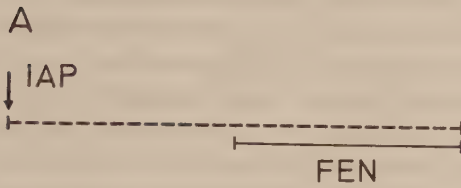
Die beschriebene starke Reduktion der Entzugskontraktion ist weniger von der zeitlichen Dauer der IAP-Exposition als von der applizierten Toxindosis abhängig (Abb. 18). Die beinahe vollständige Elimination des Entzugszeichens gelang bei einer Dosis von 120 µg/kg; bei 60 µg/kg wurde die Entzugskontraktion nur zu 50% reduziert, bei 20 µg/kg nur noch geringfügig vermindert. Die Meerschweinchen hatten 1 bzw. 4 Tage nach der IAP-Injektion für die letzten 2 Tage vor dem Versuch Fentanyl (1 µg/kg) erhalten.

Abb. 19

Beziehung zwischen Behandlungsschema und Eintritt der Wirkung von IAP. IAP (gestrichelte Linie; 120 µg/kg i.p.) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Beginn der Fentanylexposition (1 µg/h) injiziert. "Abhängigkeit" ist als Intensität der Entzugskontraktion (Naloxon, 100 nM) definiert. Die Entzugskontraktionen der Kontrollpräparate (offene Säulen) von Tieren, die für gleiche Zeiträume Fentanyl, aber kein IAP erhalten hatten, wurden zur übersichtlicheren Darstellung gleich 100% gesetzt und die Kontraktionen der Präparate von IAP-behandelten Tieren (schraffierte Säulen) darauf bezogen. Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von mindestens 12 Bestimmungen.

Behandlungsschema

Grad der Abhängigkeit



6 5 4 3 2 1

Tage vor Dekapitation

ten. Dieser Zeitraum genügte, um bei Kontrollpräparaten die Opioidabhängigkeit, gekennzeichnet durch die Entzugskontraktion, zur maximalen Ausprägung zu bringen.

Abb. 19 veranschaulicht den Einfluß verschiedener Behandlungsschemata auf die IAP-Wirkung an opioidabhängigen Präparaten. IAP (120 µg/kg) reduziert die Entzugskontraktion in hohem Maße, wenn es vor Beginn der Opioidzufuhr einwirken kann. Der vollständige Effekt trat unabhängig davon ein, ob IAP ein oder mehrere Tage vor Implantation der osmotischen Minipumpe mit Fentanyl injiziert wurde (Abb. 19 A und D). Beginn dagegen die Fentanylexposition schon mehrere Tage vor Applikation der IAP-Dosis, so kann das Toxin erstaunlicherweise die Entzugskontraktion nicht mehr modifizieren (Abb. 19 B). Weiterhin wurde untersucht, wie lange eine chronische Aktivierung der Opioidrezeptoren andauert haben muß, um die Wirkung des Toxins aufzuheben. Wenn die Fentanylzufuhr 12 Stunden vor der IAP-Injektion eingeleitet worden war, wurde die Entzugskontraktion durch IAP beträchtlich vermindert, aber nicht eliminiert (Abb. 19 C).

Vergleichende Versuche ergaben, daß nach 12-stündiger Fentanylbehandlung (1 µg/h) die durch Naloxon (100 nM) ausgelösten Entzugskontraktionen noch relativ schwach ausgeprägt sind. Während nach 48-stündiger Exposition die Kontraktionsstärke ca. 60% der elektrisch induzierten Kontraktionen entspricht, waren nach 12 Stunden erst $20 \pm 3,0$ (n=16) erreicht. Durch eine über 2 Tage hinaus verlängerte Fentanylexposition konnte das Ausmaß der Entzugskontraktion nicht gesteigert werden. Eine maximale "Abhängigkeit" ist also zu diesem Zeitpunkt etabliert (Schulz et al., 1982).

Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die Empfindlichkeit der Präparate gegenüber IAP veränderte, wenn sie sich während der Toxinexposition im Zustand des Entzuges befanden, die Opioidrezeptoren also nicht länger aktiviert wurden. Dazu wurde zunächst auf die Methode der in vitro-

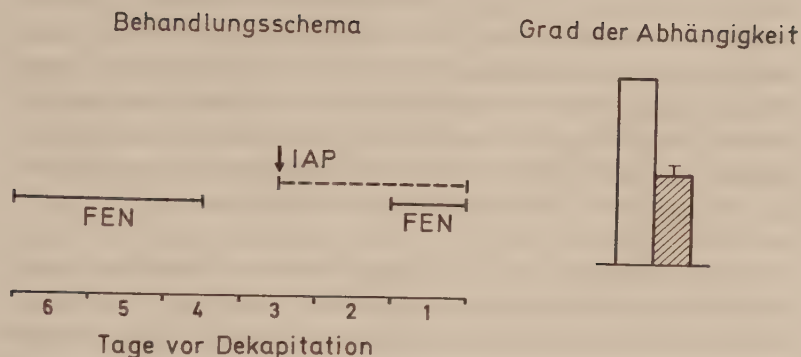


Abb. 20

Wirkung von IAP ($120 \mu\text{g/kg}$ i.p.) bei Applikation während des Opioidentzuges. 36 Stunden nach der IAP-Injektion war die Fentanylzufuhr wieder begonnen und im Organbad die Entzugskontraktion (Naloxon, 100 nM) bei Präparaten von IAP-behandelten Tieren (schraffierte Säule) und bei Kontrollpräparaten von Tieren, die ohne IAP dem gleichen Behandlungsschema unterlagen (offene Säule), gemessen worden.

Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von jeweils 12 Bestimmungen.

Applikation von IAP zurückgegriffen. Präparate von Tieren, die für 3 Tage Fentanyl ($1 \mu\text{g/h}$) erhalten hatten, wurden im Organbad für eine Stunde ohne Opioidzusatz gewaschen, bevor IAP ($1 \mu\text{g/ml}$) zugegeben wurde. Nach weiteren 2 Stunden begann eine 90-minütige Reinkubation mit Fentanyl (2 nM), bevor mit Naloxon (100 nM) Entzugskontraktionen präzipitiert wurden. IAP-inkubierte Präparate zeigten eine Kontraktionsstärke von 58% ($n=4$), Kontrollpräparate, die ohne Toxinzugabe in gleicher Weise behandelt worden waren, von 47% ($n=6$).

Nachdem in vitro in der verwendeten Dosierung kein IAP-Effekt unter Entzugs- und Reinkubationsbedingungen beobachtet werden konnte, wurde ein in vivo-Behandlungsschema

entwickelt (Abb. 20). Die osmotische Minipumpe, die für 60 Stunden Fentanyl ($1 \mu\text{g/h}$) abgegeben hatte, wurde 24 Stunden vor der IAP-Injektion ($120 \mu\text{g/kg}$) entfernt. Erst 36 Stunden nach Beginn der Toxineinwirkung wurde die Fentanylzufuhr für 24 Stunden wieder aufgenommen. Auch unter diesen Bedingungen konnte IAP die Entzugskontraktion nur teilweise eliminieren, obwohl die Aktivierung der Opioidrezeptoren durch kontinuierliche Anwesenheit des Agonisten zum Zeitpunkt der Toxinapplikation beendet war.

Weiterhin wurde geprüft, ob eine Vorbehandlung der Meerschweinchen mit dem Opioidantagonisten Naloxon die Wirkung von IAP möglicherweise modifizieren könnte. Diesen Versuchen lag die Überlegung zugrunde, daß die vergleichsweise hohe IAP-Dosis, die zur Elimination der Entzugskontraktion erforderlich ist, durch den Gehalt an endogenen Opioidpeptiden im Intestinum (North und Egan, 1983; Makhlof, 1985) bedingt sein könnte. Diese könnten, ebenso wie exogene Opiode, die vor der IAP-Applikation zugeführt werden (Abb. 19 B), eine "Resistenz" gegenüber der Einwirkung des Toxins zur Folge haben. Die Empfindlichkeit gegenüber dem IAP-Effekt ließ sich jedoch durch Vorbehandlung mit dem Opioidantagonisten nicht steigern: Präparate von Meerschweinchen, die vor der Injektion mit IAP ($20 \mu\text{g/kg i.p.}$) 3 Tage Naloxon ($100 \mu\text{g/h}$) erhalten hatten (die osmotische Minipumpe mit Naloxon wurde erst bei Beginn der Fentanylexposition entfernt), zeigten eine fast unverminderte Entzugskontraktion. Diese entsprach Befunden an Präparaten von Tieren, die IAP ($20 \mu\text{g/kg i.p.}$) ohne Naloxonvorbehandlung erhalten hatten (Abb. 18).

Wenn während der Naloxonexposition ($100 \mu\text{g/h}$) eine IAP-Dosis von $120 \mu\text{g/kg}$ injiziert wurde, bevor die 2-tägige Fentanylbehandlung begann, wurde dagegen die Entzugskontraktion vollständig eliminiert. Naloxon hatte also seinerseits keinen blockierenden Effekt auf die Wirkung des Toxins.

3.4.3. Präparate nach chronischer Clonidinbehandlung

Analog zu den im vorigen Abschnitt beschriebenen Versuchen wurden Meerschweinchen mit Clonidin vorbehandelt, um festzustellen, ob die chronische Aktivierung der adrenergen Rezeptoren ebenfalls die nachfolgende Einwirkung von IAP beeinträchtigen kann. Clonidin wurde für 6 Tage mittels osmotischer Minipumpen infundiert; 3 Tage nach der Implantation wurde IAP ($5 \mu\text{g/kg i.p.}$) injiziert. Bei einer Clonidindosis von $10 \mu\text{g/h}$ zeigte sich der gewohnte blockierende IAP-Effekt auf die Hemmung chemisch induzierter Kontraktionen (s. Abb. 13 A). Anschließend wurde die Clonidindosis auf $100 \mu\text{g/h}$ gesteigert. Diese Dosierung führte zu einer hochgradigen Toleranz gegenüber der hemmenden Wirkung von Clonidin. Die Desensitivierung betraf sowohl elektrisch als auch chemisch stimulierte Kontraktionen: beide wurden sogar durch sehr hohe Clonidinkonzentrationen (10^{-5} M) nur noch bis zu 20% gehemmt. Unter diesen Umständen konnte eine mögliche IAP-Wirkung nicht mehr differenziert werden.

3.5. Kombinierte Anwendung von Cholera- und Pertussistoxin am Plexus myentericus-Längsmuskelpräparat

Einige Präparate von Meerschweinchen, die 3 Tage vor der Dekapitation IAP ($20 \mu\text{g/kg i.p.}$) erhalten hatten, wurden in vitro für 3 Stunden mit der Standardkonzentration von 100 nM Cholera toxin inkubiert. Anschließend wurde die Ansprechbarkeit der Präparate auf Neurotensin (10 nM) getestet. Die Exposition mit Cholera toxin verringerte die Stärke der Kontraktionen im Vergleich mit Kontrollpräparaten, die unter identischen Bedingungen ohne Cholera toxin gehalten worden waren, um durchschnittlich 60%. Bei Präparaten von unbehandelten Tieren hatte die Inkubation mit Cholera toxin mit ähnlicher Intensität die Neurotensin-induzierte Exzitation reduziert (s. 3.1.1.). Die Vorbehandlung mit IAP scheint demnach keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität von Cholera toxin zu haben.

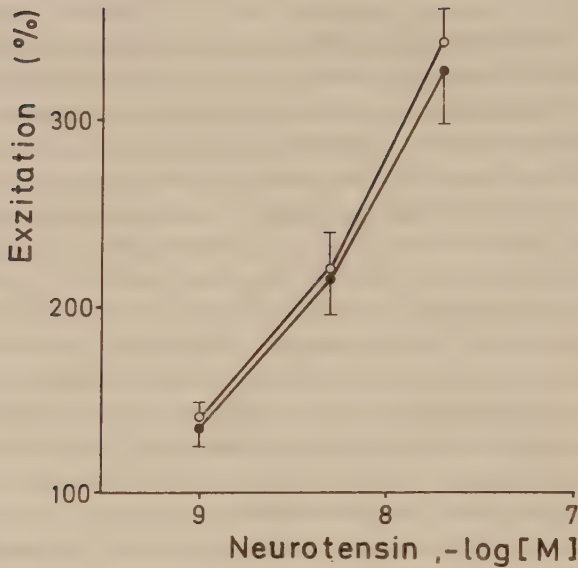


Abb. 21

Wirkung von Cholera toxin (○, 100 nM, 3 Stunden) auf die durch Neurotensin bedingte Steigerung elektrisch stimulierter Kontraktionen bei isolierten Samenleitern von Mäusen. Kontrollpräparate (●) blieben ohne Toxinexposition. Abszisse: Konzentration von Neurotensin. Ordinate: Steigerung der Kontraktionsstärke in Prozent (Ausgangskontraktionen wurden gleich 100% gesetzt).

Mittelwerte ($\pm$ S.E.M.) von 8 bis 10 Bestimmungen.

Inhibitorische Funktionen, in die IAP eingreift (Blockade der Hemmung chemisch ausgelöster Kontraktionen; s. 3.4.1.), konnten nach der Inkubation mit Cholera toxin nicht mehr geprüft werden. Letzteres macht den Testparameter, die durch Neurotensin ausgelöste Kontraktion, "unbrauchbar". Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Inkubation mit Cholera toxin ihrerseits spezifische Wirkungen von IAP tangiert.

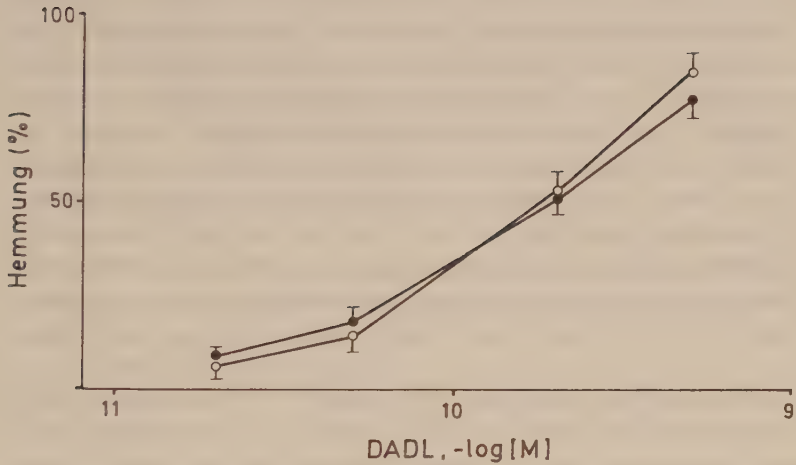


Abb. 22
Dosis-Wirkungskurven für (D-Ala², D-Leu⁵-)Enkephalin an Samenleitern von Mäusen, die 3 Tage vor Dekapitation IAP (○, 120 µg/kg i.p.) oder zum gleichen Zeitpunkt 0,9 %ige Kochsalzlösung (●, 0,1 ml, i.p.) erhalten hatten. Mittelwerte (+ S.E.M.) von 6 bis 8 Bestimmungen.

3.6. Versuche am isolierten Ductus deferens der Maus

3.6.1. Exposition mit Cholera toxin

Entsprechend dem experimentellen Vorgehen bei Plexus myentericus-Längsmuskelpräparaten wurde auch an isolierten Samenleitern von naiven Mäusen die Wirkung einer 3-stündigen in vitro-Behandlung mit Cholera toxin (100 nM) geprüft. Ductus deferentes konnten im Gegensatz zu Plexus myentericus-Präparaten nicht mehrere Stunden ohne Wechsel des Inkubationsmediums in vitro verbleiben. Schon wenn sie 30 Minuten nicht gewaschen worden waren, war sowohl bei Cholera toxin-exponierten- als auch bei Kontrollpräparaten eine starke, zunächst noch reversible Verminderung der elektrisch induzierten Kontraktionen zu beobachten. Daher

wurden sie von diesem Zeitpunkt (30 Minuten nach Zugabe von Choleratoxin) an bis zum Beginn des Testens in ca. 10-minütigen Intervallen gewaschen. Dies dürfte auf eine mögliche spezifische Toxinwirkung keinen Einfluß haben, da bekannt ist, daß die Bindung der B-Untereinheiten von Choleratoxin an Membranganglioside nach wenigen Minuten so stabil ist, daß eine Dissoziation nicht mehr stattfindet (Gill, 1977; van Heyningen, 1982). Bei den Plexus myentericus-Präparaten stellte sich der Effekt des Toxins auf exzitatorische Funktionen auch ein, wenn die Präparate nach den ersten 30 Minuten kontinuierlich gewaschen wurden.

Die isolierten Samenleiter zeigten in Abwesenheit von elektrischer Stimulation keine Reaktion auf die getesteten exzitatorischen Substanzen Neurotensin und Serotonin. Wenn bei Zugabe von Neurotensin die elektrische Stimulation fortgesetzt wurde, verursachte dieses Neuropeptid schon bei geringen Konzentrationen eine bis zu 4-fache Steigerung der Kontraktionen. Serotonin bewirkte nur einen geringfügigen Anstieg elektrisch stimulierter Kontraktionen und wurde daher nicht weiter verwendet. Abb. 21 demonstriert, daß die Wirkung von Neurotensin auf diese Kontraktionen durch die Inkubation mit Choleratoxin (100 nM) nicht beeinflußt wird.

Ebensowenig veränderte die Toxinexposition inhibitorische Funktionen: es wurde (D-Ala², D-Leu⁵-)Enkephalin getestet, das hier die gleiche hemmende Aktivität aufwies wie bei Kontrollpräparaten (die IC₅₀ lag jeweils bei 0,2 nM).

3.6.2. Exposition mit Pertussistoxin

Isolierte Samenleiter von Mäusen, die 3 oder 6 Tage vor der Dekapitation eine einmalige Injektion mit IAP (120 µg/kg, i.p.) erhalten hatten, zeigten keine Veränderung im Grad ihrer Empfindlichkeit gegenüber inhibitorisch wirkenden Substanzen. Die Opioidpeptide β-Endorphin und (D-Ala²,

D-Leu⁵-)Enkephalin (Abb. 22) und der adrenerge Agonist Clonidin hemmten elektrisch stimulierte Kontraktionen bei Kontrollpräparaten und bei Ductus deferentes von IAP-behandelten Mäusen mit gleicher Intensität. Die IC₅₀-Werte für beide Gruppen betrugen für β -Endorphin $32 \pm 4,6$ (Kontrollen) bzw. $37 \pm 5,2$ (IAP), für Clonidin $1,8 \pm 0,3$ (Kontrollen) bzw. $2,2 \pm 0,2$ (IAP). Es waren jeweils mindestens 6 Präparate getestet worden.

Die Inhibition chemisch ausgelöster Kontraktionen kann an isolierten Samenleitern nicht geprüft werden, da in Abwesenheit von elektrischer Stimulation keine neuronal bedingte Exzitation zustandekommt (s. 3.6.1.).

4. DISKUSSION

4.1. Allgemeine Charakteristika inhibitorischer und exzitatorischer Funktionen an opioidempfindlichen isolierten Organen

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkungen bakterieller Toxine (Choleratoxin und IAP) auf akute und chronische Opioidwirkungen im peripheren Nervensystem. Als Modelle dienten das isolierte Plexus myentericus-Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums und der isolierte Ductus deferens der Maus, Präparate, die Opioidrezeptoren besitzen und somit Opioidtoleranz (Ductus deferens) bzw. Opioidtoleranz und -abhängigkeit (Plexus myentericus) entwickeln können (Schulz, 1978).

Unter geeigneten experimentellen Bedingungen können Opioidwirkungen auf die neuronale Transmission sowohl durch inhibitorische als auch durch exzitatorische Phänomene gekennzeichnet sein. An einem naiven Präparat hat die Aktivierung von Opioidrezeptoren eine Hemmung neuronaler Aktivitäten zur Folge, die sich in einer reduzierten Transmitterfreisetzung äußern kann. An einem Präparat, das nach chronischer Opioidrezeptoraktivierung Abhängigkeit entwickelt hat und das kontinuierlich mit dem Opioid exponiert wird, führt die Verdrängung des Agonisten vom Opioidrezeptor (z.B. durch den Antagonisten Naloxon) zu einer Exzitation. Um die Modulation dieser Phänomene (Exzitation und Inhibition) durch Choleratoxin und IAP verständlicher zu machen, sollen zunächst die Bedingungen verdeutlicht werden, unter denen an den beiden isolierten Organen Kontraktionen durch elektrische und "chemische" Stimulation erzeugt werden und durch welche Mechanismen diese gehemmt werden können.

Der isolierte Samenleiter der Maus besitzt einen einfachen neuronalen Aufbau, bestehend aus Axonen und Nervenendigungen (Schulz, 1978). Diese Strukturen genügen offensichtlich, um eine Reaktion auf elektrische Stimulation hervor-

zurufen (Abb. 24 B). Dagegen reagieren Ductus deferens-Präparate in Abwesenheit elektrischer Stimulation nicht auf Substanzen wie Serotonin oder Neurotensin, die am Plexus myentericus-Präparat Exzitationen (tonische Kontraktion des Längsmuskels durch Acetylcholinfreisetzung) erzeugen. Opioidrezeptoren, deren Aktivierung zu einer Hemmung elektrisch ausgelöster Kontraktionen führt (Abb. 23 B), sind am Samenleiter der Maus nur an Nervenendigungen, also präsynaptisch, lokalisiert. Diese Rezeptoren weisen nach chronischer Opioidbehandlung eine verringerte Empfindlichkeit (Toleranz) gegenüber dem Agonisten auf (Abb. 23 B). Es ist jedoch nicht möglich, am opioidtoleranten isolierten Samenleiter Abhängigkeit, d.h. eine durch den Opioidantagonisten Naloxon präzipitierte Entzugskontraktion, zu demonstrieren (Abb. 23 B).

Das Plexus myentericus-Längsmuskel-Präparat zeigt dagegen einen komplexeren Aufbau seiner nervösen Versorgung (Abb. 24 A). Elektrophysiologische Untersuchungen deuten darauf hin, daß das Plexus myentericus-Präparat sowohl postsynaptisch (North et al., 1979; Dingledine und Goldstein, 1976) als auch präsynaptisch an der neuromuskulären Endplatte (Ito und Tajima, 1980) Opioidrezeptoren besitzt. Dies entspricht den Verhältnissen im zentralen Nervensystem, wo Opioidrezeptoren ebenfalls prä- und postsynaptisch zu finden sind (Simon, 1984). Opioide bewirken am Soma eine Membranhyperpolarisation, die zu einer verminderten Freisetzung von Neurotransmittern führen kann. Außerdem reduzieren sie über präsynaptische Rezeptoren die Transmitterfreisetzung (North und Williams, 1983). Es ist umstritten, welche Rolle die beiden Hemmungsmechanismen unter den Bedingungen elektrischer Stimulation für die Acetylcholinfreisetzung spielen (Szerb, 1982). Möglicherweise kontrollieren auch am elektrisch stimulierten Plexus myentericus-Präparat in Analogie zum isolierten Ductus deferens allein die an den neuromuskulären Synapsen lokalisierten Opioidrezeptoren das Ausmaß der Kontraktion, denn die elektrische Stimulation kann trotz opioidbedingter Hyperpolarisation der Somamembran an axonalen Elementen weiterhin Ak-

tionspotentiale auslösen (Abb. 24 und 25). Exzitatorisch wirkende Substanzen wie Neurotensin, die über eine Acetylcholinfreisetzung Kontraktionen der Längsmuskulatur hervorrufen (Kitabgi und Freychet, 1979), aktivieren wahrscheinlich am Soma lokalisierte Rezeptoren. Diese "chemisch" induzierten Kontraktionen könnten daher durch inhibitorische Rezeptoren auf beiden neuronalen Ebenen (Hyperpolarisation am Soma und Verminderung der Transmitterfreisetzung an der Nervenendigung) beeinflusst werden (Abb. 24 A). Nach chronischer Opioidexposition weist das Plexus myentericus-Präparat sowohl Opioidtoleranz als auch Abhängigkeit auf. Letztere drückt sich als exzitatorisches Phänomen, die durch Naloxon präzipitierte Entzugskontraktion, aus (Abb. 23 A).

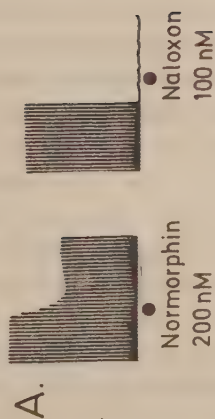
4.2. Spezifität der Effekte von Cholera- und Pertussis-toxin

Opioidrezeptoren wurden an prä- und postsynaptischen neuronalen Elementen, bislang jedoch nicht an der glatten Muskulatur nachgewiesen (Schulz, 1978). Für die Verwendung von Substanzen, die mit akuten und chronischen Opioidwirkungen an den isolierten Organen interferieren, gilt daher als Vorbedingung, daß diese die Kontraktionsfähigkeit des Muskelgewebes nicht beeinflussen. In diesem Sinne können Choleratoxin und IAP als Neurotoxine bezeichnet werden. Die Interpretation der hier dargestellten Versuchsergebnisse basiert auf der Annahme, daß die beiden Toxine in die Signaltransmission an der neuronalen Membran eingrei-

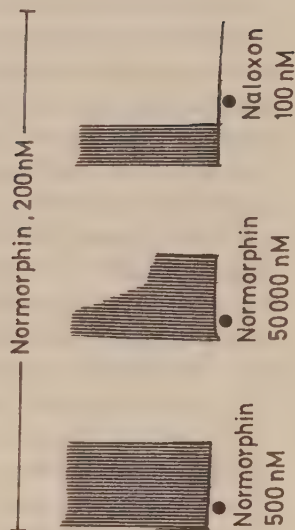
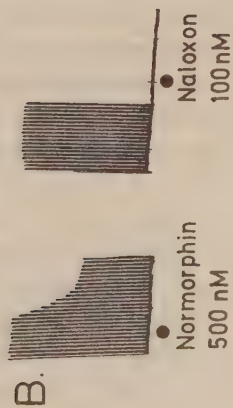
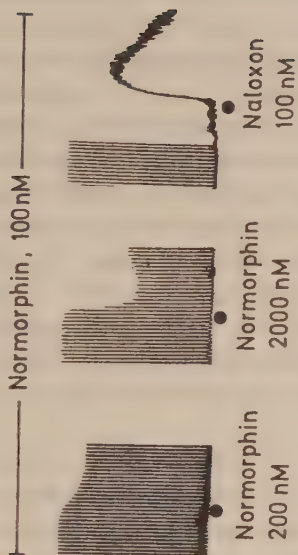
Abb. 23

Wirkung von Normorphin und Naloxon bei naiven und chronisch opioidbehandelten (Morphinpellets: an 4 Tage je 75 mg) Plexus myentericus-Längsmuskelpräparaten des Meerschweinchenileums (A) und bei naiven und chronisch opioidbehandelten (Sufentanil: 10 µg/h, 6 Tage) Ductus deferens-Präparaten der Maus (B). Die Bestimmung des Toleranzgrades gegenüber dem Opioidagonisten und der Reaktion auf den Opioidantagonisten Naloxon bei opioidbehandelten Präparaten geschah in Gegenwart von Normorphin. Naloxon wurde in Abwesenheit elektrischer Stimulation getestet.

unbehandelt



chronisch opioidbehandelt



fen, indem sie mit den GTP-bindenden Proteinen von Rezeptor-Adenylatzyklasekomplexen interagieren (Gilman, 1984). Die ADP-Ribosylierung von G-Proteinen durch Cholera toxin (exzitatorische Signaltransmission) bzw. durch IAP (inhibitorische Signaltransmission) an den neuronalen Elementen der Plexus myentericus-Präparation wurde bislang nicht direkt nachgewiesen; dennoch deuten verschiedene Beobachtungen darauf hin, daß die beiden Toxine hier über den gleichen spezifischen Mechanismus die Funktion der jeweiligen G-Proteine modulieren, der an Membranpräparationen diverser Zelltypen, darunter neuronaler Hybridzellen, direkt gezeigt wurde (Johnson, 1982; Hewlett et al., 1984). Insbesondere für IAP sind typische Effekte, die die inhibitorische Signalübermittlung betreffen, an neuronalen Membranen demonstriert worden (Nomura et al., 1985; Fujita et al., 1985; Abood et al., 1985).

Cholera toxin und IAP gehören zu einer Gruppe von bakteriellen Toxinen, deren Proteinstruktur dem sog. A-B-Modell entspricht (van Heyningen, 1982; Tamura et al., 1982). Die B-Untereinheit des Toxins übernimmt vermutlich ausschließlich die Bindung an Membranganglioside, während die A-Untereinheit in die Zellmembran eindringt und als ADP-Ribosyltransferase katalytisch aktiv ist. Für die spezifische Toxinwirkung an intakten Zellen ist die Integrität des Untereinheitenaufbaus unerläßlich. Wenn z.B. durch größere Veränderungen des pH-Wertes oder durch Erwärmung über 60°C die A-B-Konformation zerstört wird, verlieren die Toxine ihre typische biologische Wirkung (Gill, 1977; Tamura et al., 1982). Dies konnte in den hier dargestellten Versuchen ebenfalls gezeigt werden.

Der Zeitverlauf der Toxinwirkung ist ebenfalls ein Indikator für ihre Spezifität. Für das Einsetzen der biologischen Wirkung ist eine Verzögerungszeit charakteristisch, die vermutlich von der A-Untereinheit zur Penetration der Zellmembran benötigt wird (van Heyningen, 1982; Tamura et al., 1982). Entsprechende Beobachtungen wurden bei den hier beschriebenen Versuchen vor allem für das vorwiegend

in vitro angewendete Choleratoxin gemacht: vor Ablauf von ca. 60 Minuten war der typische Effekt nicht festzustellen. Allerdings konnte das Choleratoxin in dieser "Latenzphase" nicht mehr ausgewaschen werden, da die Bindung der B-Untereinheit an Membranganglioside irreversibel ist (van Heyningen, 1982). Für den Zeitpunkt des Wirkungsbeginns scheinen zwischen Choleratoxin und IAP keine gravierenden Unterschiede zu bestehen: schon drei Stunden nach der Applikation blockierte IAP inhibitorische Mechanismen deutlich, was mit Angaben aus der Literatur übereinstimmt (Cote et al., 1984; Katada et al., 1982). Für IAP wurde gezeigt, daß die biologische Wirkung u.U. viele Tage anhalten kann (Hewlett et al., 1984). Entsprechend war die Reduktion der Entzugskontraktion auch 6 Tage nach einer einmaligen IAP-Injektion noch zu beobachten.

Auch die relativ geringen Dosierungen beider Toxine, die zu deutlichen Effekten an der Plexus myentericus-Präparation führten, sprechen für die Selektivität des Wirkungsmechanismus. Für die Blockade inhibitorischer Wirkungen von Clonidin genügte bei in vivo-Behandlung eine IAP-Dosis von 5 µg/kg; Dosierungen im gleichen Bereich werden z.B. für die "Entkoppelung" von Dopaminrezeptoren im Striatum oder die Reduktion inhibitorischer Hormoneffekte an Fettzellen angegeben (Martinez-Olmedo und Garcia-Sainz, 1983; Fujita et al., 1985).

Diese Feststellungen lassen es plausibel erscheinen, daß beide Toxine an den neuronalen Membranen des Plexus myentericus ebenso spezifisch in die Signaltransmission eingreifen können wie an Zellmembranen zahlreicher anderer Organsysteme.

4.3. Studien am Plexus myentericus-Präparat

4.3.1. Wirkungen von Cholera-toxin

Cholera-toxin blockiert die exzitatorische Signaltransmission (Aktories et al., 1982). Dies wird deutlich, wenn man zunächst seine Effekte an naiven Plexus myentericus-Präparaten betrachtet: die Reaktion auf exzitatorisch wirkende Substanzen wie Neurotensin, Serotonin und Corticotropin-releasing factor wird durch die Inkubation mit Cholera-toxin zeit- und dosisabhängig vermindert. Diese Neuromodulatoren haben ihren Angriffspunkt an den Nervensomata und lösen über die Freisetzung von Acetylcholin Muskelkontraktionen aus (Kitabgi und Freychet, 1978; Adam-Vizi und Vizi, 1978; Höllt et al., 1984). Cholera-toxin modifiziert ausschließlich rezeptorvermittelte exzitatorische Funktionen, nicht jedoch die Ansprechbarkeit der Präparate auf elektrische Stimulation. Die inhibitorische Aktivität von Opioiden und Nicht-Opioiden wird ebenfalls nicht beeinflusst.

Bei chronisch opioidbehandelten Präparaten wird die Entzugskontraktion als exzitatorischer Ausdruck der Opioidabhängigkeit durch Cholera-toxin gehemmt. Da Cholera-toxin selektiv auf das G_s -Protein von (exzitatorischen) Rezeptorkomplexen einwirkt, läßt sich die Beeinträchtigung der Entzugskontraktion durch das Toxin dahingehend interpretieren, daß für die Manifestation von Opioidabhängigkeit die Freisetzung exzitatorischer Transmitter im Plexus erforderlich ist. Diese Überlegung würde die "supersensitivity"-Theorie (Collier, 1968) stützen, nach der kontinuierliche Opioidexposition eine Vermehrung von Rezeptoren für exzitatorische Neurotransmitter zur Folge hätte. In der Tat kommt es während des Opioidentzugs zu einer Überempfindlichkeit des Plexus myentericus gegenüber diesen Substanzen (Schulz und Goldstein, 1973; Schulz und Herz, 1976 a).

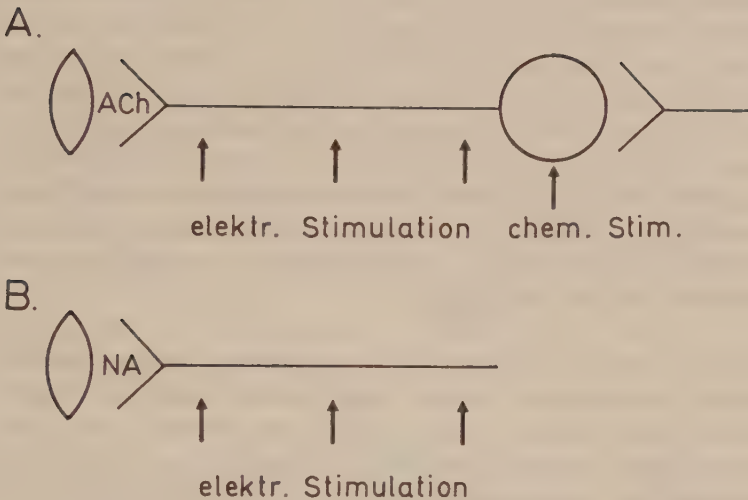


Abb. 24

Schematische Darstellung des neuroanatomischen Aufbaus der Plexus myentericus-Längsmuskelpreparation des Meerschweinchens (A) und des isolierten Ductus deferens der Maus (B). Die Plexus myentericus-Präparation besitzt im Gegensatz zum isolierten Samenleiter außer Axonen und Nervenendigungen auch Nervensomata, die ihrerseits synaptischen "Input" erhalten können. "Chemische" Stimulation durch exzitatorische Neuromodulatoren nimmt ihren Ausgang von den Somata. Um Kontraktionen durch elektrische Stimulation hervorzurufen, ist allein ein intaktes Axon erforderlich. ACh = Acetylcholin; NA = Noradrenalin

4.3.2. Wirkungen von Pertussistoxin

IAP interferiert mit dem G-Protein inhibitorischer Rezeptor-Adenylatzyklasekomplexe und sollte daher die inhibitorische Signaltransmission blockieren. Auffälligerweise wird jedoch die Hemmung elektrisch stimulierter Kontraktionen durch Opiode nicht durch IAP beeinflusst. Dies gilt auch für Nicht-Opiode wie z.B. die adrenergen bzw. puri-

nergen Substanzen Clonidin und Chloroadenosin, die ebenfalls die Acetylcholinfreisetzung an der neuromuskulären Synapse reduzieren (Deck et al., 1971; Vizi und Knoll, 1976). Die Tatsache, daß IAP inhibitorische Funktionen, die von präsynaptischen Rezeptoren kontrolliert werden (s. 4.1.), intakt läßt, deutet darauf hin, daß Opioid- und andere inhibitorische Rezeptoren im peripheren ähnlich wie im zentralen Nervensystem (Mulder und Schoffelmeer, 1985) vermutlich präsynaptisch nicht mit einem Adenylatzyklasesystem gekoppelt sind. Folglich ist präsynaptisch kein Substrat für IAP vorhanden.

Hingegen können inhibitorische Prozesse am neuronalen Soma durch IAP moduliert werden. Diese werden sichtbar gemacht, indem Kontraktionen durch "chemische" Stimulation (z.B. Neurotensin) ausgelöst werden. Die Exzitation, die an der neuromuskulären Endplatte eine Acetylcholinfreisetzung bedingt, nimmt dabei ihren Ausgang vom Nervensoma. An der Hemmung dieser neuronalen Erregung sind offensichtlich inhibitorische Rezeptoren sowohl am Soma als auch an der Nervenendigung beteiligt (Abb. 24 A und 25). Der Mechanismus der IAP-Wirkung konnte nur für Clonidin demonstriert werden, da postsynaptische adrenerge Rezeptoren offensichtlich dem Agonisten gegenüber eine größere Empfindlichkeit aufweisen als präsynaptische. Bei Opioiden und Chloroadenosin überlagerten sich die Dosis-Wirkungskurven der Hemmung elektrisch und chemisch induzierter Kontraktionen. Dagegen zeigte sich bei Clonidin eine wesentlich stärkere Hemmung der durch Neurotensin (am Soma) ausgelösten Exzitation. IAP interferiert offenbar mit den am Soma lokalisierten inhibitorischen Rezeptoren. IAP-Behandlung hat keine vollständige Blockade der Hemmung zur Folge, sondern gleicht die beiden Dosis-Wirkungskurven (Hemmung chemisch und elektrisch stimulierter Kontraktionen, s. Abb. 13) aneinander an. Dies läßt sich damit erklären, daß die Clonidinrezeptoren an den Nervenendigungen funktionstüchtig bleiben. Die geschilderten Befunde lassen darauf schließen, daß postsynaptisch lokalisierte inhibitorische Rezeptoren über G-Proteine mit dem Adenylatzykla-

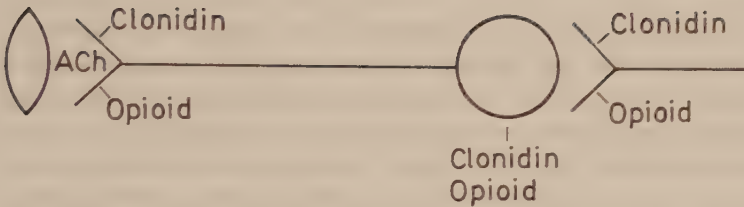


Abb. 25

Schematische Darstellung der Lokalisation von inhibitorischen Rezeptoren an den neuronalen Elementen der Plexus myentericus-Längsmuskelpräparation. Die an den Nervensomata, also postsynaptisch, lokalisierten Rezeptoren werden in ihrer Funktion durch IAP verändert, die präsynaptischen inhibitorischen Rezeptoren bleiben intakt (weitere Erläuterungen im Text).

sesystem interagieren und daher durch IAP in ihrer Funktion beeinträchtigt werden können. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß eine verminderte Affinität der Clonidinbindung an neuronalen Membranen (Cortex der Ratte) nach IAP-Behandlung beschrieben wurde (Nomura et al., 1985).

Die hier dargestellten Ergebnisse bezüglich der Unwirksamkeit von IAP auf die Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen stehen in Widerspruch zu Arbeiten von Lujan et al. (1984) und Tucker (1984), die über eine durch IAP stark verminderte Aktivität von Opioiden und Nichtopioiden, elektrisch stimulierte Kontraktionen zu hemmen, berichten. Diese Diskrepanz ist schwer zu erklären. Obwohl beide Autoren nicht die Plexus myentericus-Längsmuskelpräparation, sondern vollständige Ileumstücke verwenden, wodurch die Zuordnung von Effekten erschwert wird, kann

dies nicht allein die Ursache der unterschiedlichen Befunde sein. Auch setzte die Wirkung des Toxins in deren Untersuchungen erst nach Tagen ein, was sich mit den hier erhobenen Daten und anderen Angaben (Collier et al., 1983) nicht deckt.

Auch bei chronisch opioidbehandelten Plexus myentericus-Präparaten hat die IAP-Behandlung auf die Hemmung elektrisch stimulierter Kontraktionen keinen Einfluß; der Toleranzgrad gegenüber dem Opioidagonisten wird durch IAP nicht verändert. Dagegen greift IAP in die Entwicklung von Opioidabhängigkeit massiv ein. Abhängigkeit manifestiert sich an diesem Präparat als eine durch den Opioidantagonisten Naloxon ausgelöste Entzugskontraktion (Abb. 23 A). Der Vergleich mit dem isolierten Samenleiter der Maus (Abb. 24), der nach chronischer Opioidbehandlung keine Reaktion auf Naloxon zeigt (Abb. 23 A), legt den Schluß nahe, daß die Entstehung des Entzugssymptoms und damit die Entwicklung von Opioidabhängigkeit den neuronalen Somata zugeordnet werden muß. Nur die Anwendung von Naloxon beim opioidabhängigen Plexus myentericus-Präparat kann die am Soma lokalisierten Opioidrezeptoren "sichtbar" machen. Die bisher beschriebenen inhibitorischen und exzitatorischen Vorgänge kommen durch die Interaktion exogener Substanzen mit Rezeptoren zustande, die jeweils Hemmung oder Stimulation vermitteln. Die Entzugskontraktion stellt hingegen ein exzitatorisches Phänomen dar, das durch die Verdrängung des Opioidagonisten von dem inhibitorischen Rezeptor verursacht wird. Die Behandlung mit IAP hat, wenn sie vor oder gleichzeitig mit der chronischen Opioidzufuhr beginnt, ein vollständiges Ausbleiben der durch Naloxon präzipitierten Entzugskontraktion zur Folge. Offensichtlich wird durch die IAP-bedingte "Entkoppelung" der Opioidrezeptoren von ihrem nachgeschalteten System die kontinuierliche Aktivierung des inhibitorischen Rezeptorkomplexes, die für das Entstehen der Opioidabhängigkeit Voraussetzung ist (Wüster et al., 1985), verhindert. Die Reduktion der Entzugskontraktion durch IAP wird auch von anderen Autoren berichtet (Collier et al., 1983; Tucker,

1984).

Es ist auffällig, daß für eine komplette Elimination der Entzugskontraktion eine 20-fach höhere Dosis des Toxins benötigt wird als für die Blockade der Hemmung chemisch induzierter Kontraktionen durch Clonidin. Dieser Befund ist schwer zu deuten. Es läßt sich nicht ausschließen, daß an dem komplexen Mechanismus der Entstehung von Abhängigkeit weitere membrangebundene G-Proteine beteiligt sind, deren Signaltransmission nicht auf die Regulation des cAMP-Systems beschränkt ist (Gilman, 1984). Die Interaktion von IAP mit G-Proteinen hemmt z.B. in manchen Zellsystemen Phosphoinositolumsatz und Calciummobilisation (Murayama und Ui, 1985). Aus Membranen von Rinderhirn wurde in jüngster Zeit ein weiteres, als G_o bezeichnetes Polypeptid von unbekannter Funktion isoliert, das durch IAP ADP-ribosyliert werden kann (Sternweis und Robishaw, 1984).

Neben der Toxindosis hat das Behandlungsschema Bedeutung für die IAP-Wirkung. IAP kann offensichtlich in den Mechanismus der Opioidabhängigkeit nur eingreifen, solange diese noch nicht vollständig ausgebildet ist. Die Entstehung von Abhängigkeit wird verhindert, wenn IAP bereits vor der chronischen Aktivierung der Opioidrezeptoren einwirkt. Kommt IAP jedoch erst zur Anwendung, wenn die Opioidabhängigkeit bereits induziert worden ist, verliert es seinen Einfluß auf die Mechanismen, die für die Manifestation der Abhängigkeit verantwortlich sind. Deren Entwicklung und Aufrechterhaltung erfordert eine kontinuierliche Aktivierung der Opioidrezeptoren durch Agonisten (Schulz und Herz, 1976 a). Möglicherweise verliert das G_i -Protein des Rezeptorkomplexes im chronisch aktivierten Zustand seine Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung von IAP. Entsprechende Beobachtungen werden für den IAP-Effekt auf das GTP-bindende Protein Transducin, einen Bestandteil des retinalen Photorezeptors, berichtet (van Dop et al., 1984). Der Photorezeptor, Rhodopsin, "erkennt" und stimuliert experimentell auch das G_i -Protein des Adenylatzyklasesy-

stems, dessen ADP-Ribosylierung durch IAP in Gegenwart von (licht-)aktiviertem Rhodopsin vermindert ist (Tsai et al., 1984).

Zwei Befunde lassen sich mit dieser Hypothese nicht erklären. IAP konnte noch 12 Stunden nach Beginn der Opioidzufuhr in einem beträchtlichen Ausmaß die Entwicklung von Abhängigkeit aufhalten. Zu diesem Zeitpunkt war das Entzugssymptom als Gradmesser der Abhängigkeit bei Kontrollpräparaten erst schwach ausgeprägt; die Wirkung von IAP wurde nur geringfügig reduziert. In anderen Versuchen, in denen die Opioidzufuhr nach einigen Tagen unterbrochen und IAP im Zustand des Entzuges appliziert wurde, war dagegen seine Wirkung auf die Entzugskontraktion nach Wiederaufnahme der Opioidexposition deutlich vermindert. Obwohl also zum Zeitpunkt der IAP-Injektion die Rezeptoraktivierung aufgehört hatte, war die Interaktion von IAP mit seinem Substrat offenbar beeinträchtigt. Man muß annehmen, daß die Ausbildung von Opioidabhängigkeit mit längeranhaltenden funktionellen Veränderungen des G_i -Proteins einhergeht, z.B. hinsichtlich der Konformation, die auch ohne Dissoziation der Untereinheiten modifiziert werden kann (Codina et al., 1984).

Aus diesen Feststellungen bezüglich der Bedeutung des Applikationszeitpunktes für die IAP-Wirkung erklärt sich auch, warum bei in vitro-Anwendung keine Reduktion der Entzugskontraktion gesehen wurde. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte IAP erst nach der Entwicklung von Opioidabhängigkeit, die bereits in vivo stattfand, einwirken und zu diesem Zeitpunkt mit dem Mechanismus nicht mehr interferieren.

Eine Vorbehandlung mit dem Opioidantagonisten Naloxon konnte die Wirkung von IAP auf die Opioidabhängigkeit weder abschwächen noch verstärken. Naloxon kann zwar nach chronischer Behandlung eine Zunahme von Opioidrezeptorbindungsstellen induzieren (Schulz et al., 1979), hat aber offensichtlich als Antagonist keine Eigenwirkung auf Re-

zeptorkoppelungsmechanismen.

4.4. Studien am isolierten Ductus deferens

Choleratoxin und IAP wurden ebenfalls am Ductus deferens-Präparat getestet, das wegen seines neuroanatomischen Aufbaus ein interessantes Vergleichsmodell zum Plexus myentericus-Längsmuskelpräparat darstellt (Abb. 23 und 24). Es erwies sich als schwierig, am isolierten Samenleiter neuronal bedingte exzitatorische Funktionen zu prüfen, da an diesem Präparat, das keine Nervensomata besitzt, in Abwesenheit von elektrischer Stimulation durch exzitatorisch wirkende Neuromodulatoren keine Kontraktion hervorzurufen war. Allerdings konnte durch Neurotensin eine erhebliche Verstärkung elektrisch stimulierter Kontraktionen bewirkt werden. Die Inkubation mit Choleratoxin hatte keine Hemmung dieser Kontraktionssteigerung zur Folge, ein Hinweis darauf, daß dieses exzitatorische Phänomen wahrscheinlich nicht über Adenylatzyklase-gekoppelte Rezeptoren ausgelöst wird.

IAP hatte am isolierten Samenleiter ebenso wie am Plexus myentericus-Präparat keinen Effekt auf die Hemmung elektrisch stimulierter Kontraktionen durch Opiode (z.B. β -Endorphin) und Nicht-Opiode (Clonidin). Der isolierte Samenleiter besitzt nur präsynaptische inhibitorische Rezeptoren (Abb. 24 B). Die hier vorliegenden Daten bezüglich der Unwirksamkeit von IAP und Berichte anderer Autoren (North und Vitek, 1980; Rubini et al., 1982) unterstützen die Auffassung, daß Opioidrezeptoren an den Nervenendigungen des isolierten Ductus deferens wahrscheinlich nicht mit einem Adenylatzyklasesystem gekoppelt sind.

4.5. Schlußfolgerungen bezüglich der Mechanismen von Opioidtoleranz und -abhängigkeit

Nach den hier dargestellten Untersuchungen zur Wirkung von

Choleratoxin und IAP auf die exzitatorische bzw. inhibitorische Signaltransmission am opioidabhängigen Plexus myentericus muß man es für unwahrscheinlich halten, daß Toleranz und Abhängigkeit grundsätzlich auf einem gemeinsamen biochemischen Mechanismus, z.B. durch Adaptation der Adenylatzyklase (Sharma et al., 1975), auf der Ebene des opioidempfindlichen Neurons (Collier, 1980), beruhen. Obwohl beide Phänomene in vivo gemeinsam auftreten (Goldstein, 1974), ist es bei detaillierterer Betrachtung möglich, sie zumindest am Plexus myentericus des Meerschweinchens zu separieren und ihnen verschiedene neuronale Ebenen zuzuordnen (Wüster et al., 1985).

Aus den vorliegenden Befunden ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die an den Nervenendigungen (=präsynaptisch) lokalisierten Opioidrezeptoren, die den Toleranzgrad bestimmen, vermutlich nicht mit einem Adenylatzyklasesystem zusammenwirken. Dies gilt für den isolierten Samenleiter, der hochgradige Toleranz entwickeln kann (Schulz et al., 1980), ebenso wie für die Plexus myentericus-Längsmuskelpräparation, bei der IAP die Funktion präsynaptisch lokalisierter - naiver oder toleranter - Opioidrezeptoren nicht verändert. Der Plexus myentericus weist zusätzlich postsynaptisch, also am Nervensoma, gelegene Opioidrezeptoren auf (Abb. 25), die über GTP-bindende Proteine mit dem Effektorsystem, der Adenylatzyklase, interagieren und daher der IAP-Wirkung zugänglich sind. Diese postsynaptischen Rezeptoren sind in die Entstehung von Opioidabhängigkeit involviert; ihre "Entkoppelung" durch IAP verhindert die Ausbildung von Abhängigkeit. Ein Entzugssymptom kann - durch die Verdrängung des Opioidagonisten vom Rezeptor! - nur präzipitiert werden, wenn die inhibitorische Signaltransmission intakt bleibt.

Das Zustandekommen der Entzugskontraktion als Ausdruck der Opioidabhängigkeit beim Plexus myentericus-Präparat ist ein komplexer Vorgang, der nicht nur die kontinuierliche Aktivierung eines funktionstüchtigen inhibitorischen Rezeptorkomplexes benötigt, sondern auch auf eine intakte

exzitatorische Signaltransmission angewiesen ist. Möglicherweise kommt es bei chronischer Opioidewirkung zu einer "Überempfindlichkeit" postsynaptischer exzitatorischer Rezeptoren gegenüber synaptischem "Input" vom neuronalen Netzwerk. Die Wirkung von Cholera-toxin auf exzitatorische Funktionen am naiven und opioidabhängigen Plexus myentericus-Präparat spricht für diese Hypothese.

Zusammenfassend soll betont werden, daß Cholera-toxin und IAP zwar beide am opioidabhängigen Plexus myentericus-Präparat die durch Naloxon präzipitierte Entzugskontraktion hemmen, doch daß dem sehr unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen: Cholera-toxin inaktiviert die exzitatorische Signaltransmission und beeinträchtigt dadurch die akute Manifestation der Abhängigkeit, während IAP durch die "Entkoppelung" des inhibitorischen Rezeptors von vornherein die Entstehung von Opioidabhängigkeit verhindert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird seit langem diskutiert, ob Opioidtoleranz und -abhängigkeit auf einen einheitlichen biochemischen Mechanismus, z.B. auf eine Adaptation der Adenylatzyklase, zurückzuführen sind ("unitary theory"). Verschiedene experimentelle Befunde stellen diese Theorie in Frage.

So wurde die Entwicklung von Opioidtoleranz und/oder -abhängigkeit an isolierten peripheren Organen, dem Plexus myentericus-Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums und dem Ductus deferens der Maus, studiert. Während das Plexus myentericus-Präparat, welches chronisch opioid-behandelten Meerschweinchen entnommen wurde, sowohl Toleranz (verminderte Hemmung elektrisch stimulierter Kontraktionen durch Opioidagonisten) als auch Abhängigkeit (definiert durch eine Naloxon-präzipitierte Entzugskontraktion) aufweist, läßt sich am isolierten Ductus deferens auffälligerweise zwar Toleranz, jedoch kein Entzugssymptom demonstrieren. Dies beruht vermutlich auf den unterschiedlichen neuroanatomischen Verhältnissen: die Plexus myentericus-Präparation besitzt ein vollständiges neuronales Netzwerk mit Nervenzellkörpern, während der isolierte Ductus deferens nur Axone und Nervenendigungen enthält. Opioidrezeptoren befinden sich demnach am Ductus deferens allein an Nervenendigungen (präsynaptisch), während sie am Plexus myentericus-Präparat sowohl prä- als auch postsynaptisch (an Somata) lokalisiert sein können.

Opioide kontrollieren über ihre Rezeptoren u.a. auch die Aktivität der Adenylatzyklase. Dies geschieht über ein inhibitorisches "G-Protein" (G_i). Rezeptoren für exzitatorische Neuromodulatoren sind über ein stimulatorisches "G-Protein" (G_s) mit der Adenylatzyklase gekoppelt. Diese G-Proteine sind Substrate für die ADP-Ribosylierung durch bakterielle Toxine: die Funktion von G_s wird durch Cholera-toxin, die Funktion von G_i durch Pertussistoxin (IAP) irreversibel gehemmt.

In den hier vorgenommenen Versuchen wurde an den genannten isolierten Organen die Signaltransmission von exzitatorischen bzw. inhibitorischen Rezeptoren durch Choleratoxin bzw. IAP moduliert. Dabei interessierte vor allem die Wirkung auf akute und chronische opioiderge Mechanismen.

Zu diesem Zweck wurden naive und opioidabhängige Plexus myentericus-Präparate in vitro mit Choleratoxin (100 nM) bis zu 5 Stunden inkubiert. Dies führte zu einer verminderten Ansprechbarkeit auf exzitatorische Substanzen; bei opioidbehandelten Präparaten kam es zu einer Reduktion der durch Naloxon ausgelösten Entzugskontraktion. Dagegen wurden inhibitorische Funktionen nicht verändert.

IAP wurde wegen der längeren Latenzzeit der Wirkung den Meerschweinchen injiziert. Es hatte weder bei naiven noch bei opioidabhängigen Plexus myentericus-Präparaten einen Effekt auf die durch Opiode oder Nicht-Opiode bewirkte Hemmung elektrisch stimulierter Kontraktionen. Dagegen blockierte IAP (5 µg/kg) die Hemmung, die Clonidin auf "chemisch" (d.h. durch Neurotensin) ausgelöste Kontraktionen ausübt. Wurde IAP (120 µg/kg) vor der chronischen Opioidbehandlung verabfolgt, so konnte bei diesen Präparaten in vitro durch Naloxon kein Entzugssymptom mehr präzipitiert werden. Kontraktionen, die durch exzitatorische Neuromodulatoren hervorgerufen werden, wurden dagegen nicht beeinträchtigt. Auch der Toleranzgrad gegenüber dem Opioid blieb unberührt.

Bei Ductus deferens-Präparaten ließen sich neuronale Funktionen (Hemmung elektrisch stimulierter Kontraktionen durch Opiode; Steigerung dieser Kontraktionen durch Neurotensin) weder durch IAP noch durch Choleratoxin beeinflussen.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt unter der Annahme, daß die Hemmung elektrisch stimulierter Kontraktionen - in Analogie zum isolierten Ductus deferens - auch beim Plexus myentericus-Präparat die Aktivität von inhibitorischen

schen, an den neuromuskulären Nervenendigungen lokalisierten, Rezeptoren widerspiegelt. Diese Rezeptoren sind offensichtlich bei beiden isolierten Organen nicht an ein Adenylatzyklasesystem gekoppelt, da IAP auf ihre Funktion keinen Einfluß hat. Sowohl die akute Opioidwirkung als auch der Toleranzgrad blieben nach IAP-Exposition unbeeinträchtigt.

Dagegen kann die Hemmung "chemisch" ausgelöster Kontraktionen die Aktivität postsynaptischer inhibitorischer Rezeptoren reflektieren. Beim opioidabhängigen Plexus myentericus-Präparat wird eine Entzugskontraktion ausgelöst, wenn Naloxon den Agonisten von postsynaptischen Opioidrezeptoren verdrängt. Die chronische Aktivierung dieser postsynaptischen Rezeptoren ist Vorbedingung für die Entstehung von Abhängigkeit. Die Blockade der inhibitorischen Signaltransmission durch IAP verhindert offensichtlich die Entwicklung von Opioidabhängigkeit. Deren Manifestation erfordert vermutlich zusätzlich die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter im Plexus myentericus. Ihre Wirkung wird durch Choleratoxin gehemmt, indem es die exzitatorische Signaltransmission unterbricht. Die Wirkungen von IAP und Choleratoxin stehen in Einklang mit der Annahme, daß postsynaptische inhibitorische und exzitatorische Rezeptoren im Plexus myentericus mit dem Adenylatzyklasesystem gekoppelt sind.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
G-Protein	guaninnukleotidbindendes Protein
$G_i = N_i$	inhibitorisches G-Protein des Adenylatzyklasesystems
$G_s = N_s$	stimulatorisches G-Protein des Adenylatzyklasesystems
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IAP	Pertussistoxin ("islet-activating protein")
IC_{50}	Konzentration, bei der eine 50-prozentige Hemmung der Kontraktionen eintritt
i.p.	intraperitoneal
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abood, M.E., Law, P.Y. and Loh, H.H. (1985) Pertussis toxin in treatment modifies opiate action in the rat brain striatum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 477-483.
- Adam-Vizi, V. and Vizi, E.S. (1978) Direct evidence of acetylcholine releasing effect of serotonin in the Auerbach plexus. J. Neural Transmiss. 42, 127-138.
- Aktories, K., Schultz, G. and Jakobs, K.H. (1982) Cholera-toxin inhibits prostaglandin E_1 but not adrenalin-induced stimulation of GTP hydrolysis in human platelet membranes. Febs Lett. 146, 65-68.
- Andrade, R., Vandermaelen, C.P. and Aghajanian, G.K. (1983) Morphine tolerance and dependence in the locus coeruleus: single cell studies in brain slices. Europ. J. Pharmacol. 91, 161-169.
- Blume, A. (1978) Interactions of ligands with the opiate receptors of brain membranes: regulation by ions and nucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1713-1717.
- Burns, D.L., Hewlett, E.L., Moss, J. and Vaughan, M. (1983) Pertussis toxin inhibits enkephalin stimulation of GTPase of NG 108-15 cells. J. Biol. Chem. 258, 1435-1438.
- Cassel, D. and Pfeuffer, T. (1978) Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2669-2673.
- Ceballos, M.L. de and Felipe, C. de (1984) Circannual variation in opioid receptor sensitivity in mouse vas deferens. Europ. J. Pharmacol. 106, 227-228.
- Chang, K.-J., Eckel, R.W. and Blanchard, S.G. (1982) Opioid peptides induce reduction of enkephalin receptors in cultured neuroblastoma cells. Nature 296, 446-448.
- Childers, S. and Snyder, S.H. (1980) Differential regulation by guanine nucleotides of opiate agonist and antagonist receptor interactions. J. Neurochem. 34, 583-593.
- Codina, J., Hildebrandt, J.D., Birnbaumer, L. and Sekura, R.D. (1984) Effects of guanine nucleotides and Mg on human erythrocyte N_1 and N_s , the regulatory components

- of adenylyl cyclase. J. Biol. Chem. 259, 11408-11418.
- Collier, H.O.J. (1968) Supersensitivity and dependence. Nature 220, 229-231.
- Collier, H.O.J. and Roy, A.C. (1974) Morphine-like drugs inhibit the stimulation by E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. Nature 248, 24-27.
- Collier, H.O.J. (1980) Cellular site of opiate dependence. Nature 283, 625-629.
- Collier, H.O.J., Plant, N.T. and Tucker, J.F. (1983) Pertussis vaccine inhibits the chronic but not acute action of normorphine on the myenteric plexus of guinea-pig ileum. Europ. J. Pharmacol. 91, 325-326.
- Costa, T., Aktories, K., Schultz, G. and Wüster, M. (1983) Pertussis toxin decreases opiate receptor binding and adenylyl inhibition in a neuroblastoma x glioma hybrid cell line. Life Sci. 33, 219-222.
- Cote, T.E., Frey, E.A. and Sekura, R.D. (1984) Altered activity of the inhibitory guanyl nucleotide-binding component (N_i) induced by pertussis toxin. J. Biol. Chem. 259, 8693-8698.
- Cox, B.M. and Padhya, R. (1977) Opiate binding and effect in ileum preparations from normal and morphine pretreated guinea-pigs. Brit. J. Pharmacol. 61, 271-278.
- Deck, R. von, Oberdorf, A. and Kroneberg, G. (1971) The effect of 2-(2,b-dichlor-phenylamino)-2-imidazoline-hydrochloride (clonidine) on contraction of and acetylcholine liberation in the isolated guinea pig ileum stimulated coaxially-electrically. Arzneimittelforsch. 21, 1580-1584.
- Dingledine, R. and Goldstein, A. (1976) Effect of synaptic transmission blockade on morphine action in the guinea-pig myenteric plexus. J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 97-106.
- Dop, C. van, Yamanaka, G., Steinberg, F., Sekura, R.D., Manclark, C.R., Stryer, L. and Bourne, H.R. (1984) ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolysis of GTP and cGMP in retinal photoreceptors. J. Biol. Chem. 259, 23-26.

- Fujita, N., Nakahiro, M., Fukuchi, J., Saito, K. and Yoshida, H. (1985) Effects of pertussis toxin on D_2 -dopamine receptor in rat striatum: evidence for coupling of N_1 regulatory protein with D_2 -receptor. Brain Res. **333**, 231-236.
- Gabella, G. (1972) Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. J. Anat. **111**, 69-97.
- Gill, D.M. (1977) Mechanism of action of cholera toxin. Adv. Cyclic Nucleotide Res. **8**, 85-118.
- Gill, D.M. and Meren, R. (1978) ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3050-3054.
- Gillan, M.G.C., Kosterlitz, H.W., Robson, L.E. and Waterfield, A. (1979) The inhibitory effects of presynaptic α -adrenoceptor agonists on contractions of guinea-pig ileum and mouse vas deferens in the morphine-dependent and withdrawn states produced in vitro. Brit. J. Pharmacol. **66**, 601-608.
- Gilman, A.G. (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. Cell **36**, 577-579.
- Goldstein, D.B. and Goldstein, A. (1961) Possible role of enzyme inhibition and repression in drug tolerance and addiction. Biochem. Pharmacol. **8**, 48.
- Goldstein, A. and Goldstein, D.B. (1968) Enzyme expansion theory of drug tolerance and physical dependence. In: The Addictive States. Herausgegeben von A. Wikler, Williams and Wilkins, Baltimore, S. 265-267.
- Goldstein, A. und Schulz, R. (1973) Morphine-tolerant longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol. **48**, 655-666.
- Goldstein, A. (1974) Tolerance and physical dependence in the central nervous system. In: Principles of Drug Action. Herausgegeben von A. Goldstein, L. Aronow, S.M. Kalman, John Wiley & sons, New York, S. 586-615.
- Gyang, E.A. and Kosterlitz, H.W. (1966) Agonist and antagonist actions of morphine-like drugs on the guinea-pig isolated ileum. Brit. J. Pharmacol. **27**, 514-527.
- Haas, H. (1981) Die suchterzeugenden Drogen. In: Ursprung,

- Geschichte und Idee der Arzneimittellkunde. Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, S. 62-86.
- Henderson, G., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W. (1972) A new example of a morphine-sensitive neuroeffector junction: adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Brit. J. Pharmacol. **46**, 764-766.
- Hewlett, E.L., Cronin, M.J., Moss, J., Anderson, H., Myers, G.A. and Pearson, R.D. (1984) Pertussis toxin: lessons from biological and biochemical effects in different cells. Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res. **17**, 173-182.
- Heyningen, S. van (1982) Similarities in the action of different toxins. In: Molecular Action of Toxins and Viruses. Herausgegeben von P. Cohen and S. v. Heyningen, Elsevier, Amsterdam, S. 169-189.
- Hildebrandt, J.D., Sekura, R.D., Codina, J., Iyengar, R., Manclark, C.R. and Birnbaumer, L. (1983) Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. Nature **302**, 706-709.
- Hildebrandt, J.D., Codina, J., Risinger, R. and Birnbaumer, L. (1984) Identification of a γ subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins N_s and N_1 . J. Biol. Chem. **259**, 2039-2042.
- Höllt, V. and Wüster, M. (1978) The opiate receptors. In: Developments in opiate research. Herausgegeben von A. Herz, Marcel Dekker, New York, S. 1-65.
- Höllt, V., Garzon, J., Schulz, R. and Herz, A. (1984) Corticotropin-releasing factor is excitatory in the guinea-pig ileum and activates an opioid mechanism in this tissue. Europ. J. Pharmacol. **101**, 165-166.
- Houslay, M.D. (1984) A family of guanine nucleotide regulatory proteins. Trends Biochem. Sci. **9**, 39-40.
- Hughes, J. (1981) Peripheral opiate receptor mechanisms. Trends Pharmacol. Sci. **2**, 21-24.
- Hughes, S.M. (1983) Are guanine nucleotide binding proteins a distinct class of regulatory proteins? Febs Lett. **164**, 1-8.
- Ito, M. and Tajima, K. (1980) Action of morphine on the neuro-effector transmission in the guinea-pig ileum and

- the mouse vas deferens. J. Physiol. (Lond.) 307, 367-384.
- Jaffe, J.H. (1980) Drug addiction and drug abuse. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Herausgegeben von L.S. Goodman, A. Gilman, McMillan, London, S. 535-584.
- Johnson, G.L. (1982) Cholera toxin action and the regulation of hormone-sensitive adenylate cyclase. In: Molecular Actions of Toxins and Viruses. Herausgegeben von P. Cohen und S. v. Heyningen, Elsevier, Amsterdam, S. 33-49.
- Johnson, S.M. and Duggan, A.W. (1984) Dependence in the absence of tolerance to morphine. Europ. J. Pharmacol. 97, 305-308.
- Katada, T., Amano, T. and Ui, M. (1982) Modulation by islet-activating protein of adenylate cyclase activity in C₆ glioma cells. J. Biol. Chem. 257, 3739-3746.
- Katada, T. and Ui, M. (1982) Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3129-3133.
- Kitabgi, P. and Freychet, P. (1979) Neurotensin contracts the guinea-pig longitudinal ileal smooth muscle by inducing acetylcholine release. Europ. J. Pharmacol. 56, 403-406.
- Koski, G. and Klee, W.A. (1981) Opiates inhibit adenylate cyclase by stimulating GTP hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4185-4189.
- Kosterlitz, H.W., Lydon, R.J. and Watt, A.J. (1970) The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoreceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol. 39, 398-406.
- Kosterlitz, H.W. and Waterfield, A.A. (1975) In vitro models in the study of structure - activity relationships of narcotic analgesics. Ann. Rev. Pharmacol. 15, 29-47.
- Law, P.Y., Hom, D.S. and Loh, H.H. (1982) Loss of opiate-receptor activity in neuroblastoma x glioma NG 108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. Mol. Phar-

macol. 22, 1-4.

- Leslie, F.M. and Kosterlitz, H.W. (1979) Comparison of binding of [^3H]-methionine-enkephalin, [^3H]-naltrexone and [^3H]-dihydromorphine in the mouse vas deferens and the myenteric plexus and brain of the guinea pig. Europ. J. Pharmacol. 56, 379-383.
- Lord, J.A.H., Waterfield, A.H., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W. (1976) Multiple opiate receptors. In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides. Herausgegeben von H.W. Kosterlitz, Elsevier, Amsterdam, S. 275-280.
- Lujan, M., Lopez, E., Ramirez, R., Aguilar, H., Martinez-Olmedo, M.A. and Garcia-Sainz, J.A. (1984) Pertussis toxin blocks the action of morphine, norepinephrine and clonidine on isolated guinea-pig ileum. Europ. J. Pharmacol. 100, 377-380.
- Makhoulouf, G.M. (1985) Enteric neuropeptides: role in neuromuscular activity of the gut. Trends Pharmacol. Sci. 6, 214-218.
- Martin, W.R. (1968) A homeostatic and redundancy theory of tolerance to and dependence on narcotic analgesics. Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 46, 206-225.
- Martinez-Olmedo, M.A. and Garcia-Saiz, J.A. (1983) Effect of pertussis toxin on the hormonal regulation of cyclic AMP levels in hamster fat cells. Biochim. Biophys. Acta 760, 215-220.
- Mulder, A.H. and Schoffelmeer, N.M. (1985) Catecholamine and opioid receptors, presynaptic inhibition of CNS neurotransmitter release, and adenylate cyclase. Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res. 19, 273-286.
- Murayama, T. and Ui, M. (1985) Receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase and stimulation of arachidonic acid release in 3T3 fibroblasts. J. Biol. Chem. 260, 7226-7233.
- Nomura, Y., Kitamura, Y. and Segawa, T. (1985) Decrease of clonidine binding affinity to α_2 -adrenoceptor by ADP-ribosylation of 41000-Dalton proteins in rat cerebral cortical membranes by islet-activating protein. J. Neurochem. 44, 364-369.
- North, R.A., Katayama, Y. and Williams, J.T. (1979) On the

- mechanism and site of action of enkephalin on single myenteric neurones. Brain Res. 165, 67-78.
- North, R.A. and Vitek, L.V. (1980) A study of the role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate in the depression by opiates and opioid peptides of excitatory junction potentials in the mouse vas deferens. Brit. J. Pharmacol. 71, 307-313.
- North, R.A. and Egan, T.M. (1983) Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. Brit. Med. Bull. 39, 71-75.
- North, R.A. and Williams, J.T. (1983) How do opiates inhibit neurotransmitter release? Trends Neurosci. 6, 337-339.
- Paton, W.D.M. (1955) The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. Proc. Physiol. Soc. 127, 40 P - 41 P.
- Paton, W.D.M. (1957) The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol. 11, 119-127.
- Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. Science 179, 1011-1014.
- Probst, F. and Hamprecht, B. (1981) Opioids, noradrenaline and GTP analogs inhibit cholera toxin activated adenylate cyclase in neuroblastoma x glioma hybrid cells. J. Neurochem. 36, 580-588.
- Rang, H.P. (1964) Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. Brit. J. Pharmacol. 22, 356-365.
- Rodbell, M. (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 284, 17-22.
- Rubini, P., Schulz, R., Wüster, M. and Herz, A. (1982) Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, 142-146.
- Sabol, S.L. and Nirenberg, M. (1979) Regulation of adenylate cyclase of neuroblastoma x glioma hybrid cells by α -adrenergic receptors. J. Biol. Chem. 254, 1913-1920.

- Schulz, R. and Goldstein, A. (1973) Morphine tolerance and supersensitivity to 5-hydroxytryptamine in the myenteric plexus of the guinea-pig. Nature **244**, 168-170.
- Schulz, R. and Herz, A. (1976 a) Aspects of opiate dependence in the myenteric plexus of the guinea-pig. Life Sci. **19**, 1117-1128.
- Schulz, R. and Herz, A. (1976 b) Dependence liability of enkephalin in the myenteric plexus of the guinea-pig. Europ. J. Pharmacol. **39**, 429-432.
- Schulz, R. (1978) The use of isolated organs to study the mechanism of action of narcotic analgesics. In: Developments in opiate research. Herausgegeben von A. Herz, Marcel Dekker, New York, S. 241-277.
- Schulz, R., Wüster, M. and Herz, A. (1979) Supersensitivity to opioids following the chronic blockade of endorphin action by naloxone. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **306**, 93-96.
- Schulz, R., Wüster, M., Krenss, H. and Herz, A. (1980) Selective development of tolerance without dependence in multiple opiate receptors of mouse vas deferens. Nature **285**, 242-243.
- Schulz, R., Seidl, E., Wüster, M. and Herz, A. (1982) Opioid dependence and cross-dependence in the isolated guinea-pig ileum. Europ. J. Pharmacol. **84**, 33-40.
- Schulz, R., Seidl, E. and Herz, A. (1985) Opioid dependence in the guinea-pig myenteric plexus is controlled by non-tolerant and tolerant opioid receptors. Europ. J. Pharmacol. **110**, 335-341.
- Sharma, S.K., Klee, W.A. and Nirenberg, M. (1975) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3092-3096.
- Shuster, L. (1961) Repression and de-repression of enzyme synthesis as a possible explanation of some aspects of drug action. Nature **189**, 314-315.
- Simon, E.J., Hiller, J.M. and Edelman, J. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine to rat brain homogenate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 1947-1949.

- Simon, E.J. (1984) Opiate receptors. Handbook of Neurochemistry 6, 331-352.
- Smith, S.K. and Limbird, L.E. (1982) Evidence that human platelet α -adrenergic receptors coupled to inhibition of adenylate cyclase are not associated with the subunit of adenylate cyclase ADP-ribosylated by cholera toxin. J. Biol. Chem. 257, 10471-10478.
- Spiegel, A.M., Gierschik, P., Levine, M.A. and Downs, R.W. (1985) Clinical implications of guanine nucleotide-binding proteins as receptor-effector couplers. N. Engl. J. Med. 312, 26-33.
- Sternweis, P.C. and Robinshaw, J.D. (1984) Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. J. Biol. Chem. 259, 13806-13813.
- Sunyer, T., Codina, J. and Birnbaumer, L. (1984) GTP hydrolysis by pure N_i , the inhibitory regulatory component of adenylate cyclases. J. Biol. Chem. 259, 15447-15451.
- Szerb, J.C. (1982) Correlation between acetylcholine release and neuronal activity in the guinea-pig ileum myenteric plexus; effect of morphine. Neuroscience 7, 327-340.
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. and Ishii, S. (1982) Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. Biochemistry 21, 5516-5522.
- Terenius, L. (1973) Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fractions from the brain. Acta Pharmacol. Toxicol. 33, 377-384.
- Terenius, L. (1975) Narcotic receptors in guinea-pig ileum and rat brain. Neurosciences Res. Prog. Bull. 13, 39-42.
- Traber, J., Fischer, K., Latzin, S. and Hamprecht, B. (1975) Morphine antagonises action of prostaglandin in neuroblastoma and neuroblastoma x glioma hybrid cells. Nature 253, 120-122.
- Tsai, S., Adamik, R., Kanaho, Y., Hewlett, E.L. and Moss,

- J. (1984) Effects of guanyl nucleotides and rhodopsin on ADP-ribosylation of the inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase by pertussis toxin. J. Biol. Chem. 259, 15320-15323.
- Tucker, J.F. (1984) Effect of pertussis toxin on normorphine-dependence and on acute inhibitory effects of normorphine and clonidine in guinea-pig isolated ileum. Brit. J. Pharmacol. 83, 326-328.
- Ui, M. (1984) Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. Trends Pharmacol. Sci. 5, 277-279.
- Vizi, E.S. and Knoll, J. (1976) The inhibitory effect of adenosine and related nucleotides on the release of acetylcholine. Neuroscience 1, 391-398.
- Wei, L. and Loh, H. (1976) Physical dependence on opiate-like peptides. Science 193, 1262-1263.
- World Health Organization (1974) Expert Committee on Drug Dependence: Twentieth Report. Technical Report No. 551, Genf.
- Wüster, M., Schulz, R. and Herz, A. (1981) Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations. Biochem. Pharmacol. 30, 1883-1887.
- Wüster, M., Costa, T. and Gramsch, Ch. (1983) Uncoupling of receptors is essential for opiate-induced desensitization (tolerance) in neuroblastoma x glioma hybrid cells NG 108-15. Life Sci. 33, 341-344.
- Wüster, M., Schulz, R. and Herz, A. (1985) Opioid tolerance and dependence: re-evaluating the unitary hypothesis. Trends Pharmacol. Sci. 6, 64-67.
- Yajima, M., Hosoda, K., Kanbayashi, Y., Nakamura, T., Nogimori, K., Mizushima, Y., Nakase, Y. and Ui, M. (1978) Islets-activating protein (IAP) in Bordetella pertussis that potentiates insulin secretory responses of rats. J. Biochem. 83, 295-303.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Herz für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. R. Schulz für die geduldige und anregende Beratung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke Frau K. Metzner für die gute Zusammenarbeit im Labor, Frau U. Bäuerle für das Anfertigen der Zeichnungen und Herrn R. Scheiler für die Erstellung des Manuskripts.

Lebenslauf

26. April 1958	in Herford geboren Eltern: Prof. Dr. med. Hans-Dieter Lux und Dr. phil. Anita Lux, geb. Moritz
1964 bis 1968	Grundschule in Bethesda/USA und München
1968 bis 1976	Besuch des Sophie-Scholl-Gymnasiums in München
1976 bis 1983	Studium der Medizin an der Ludwig-Maxi- milians-Universität München
Mai 1983	Approbation zum Arzt
ab Mai 1983	Ausführung der vorliegenden Arbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie (Martinsried/München), Abteilung Neuro- pharmakologie (Leiter: Prof. Dr. A. Herz)

